Ein Beitrag zur Untersuchung der Biosynthese des Tryptpophans in Saccharomyces cerevisiae

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Wolfgang Lück
aus Sensburg/Ostpreussen

1964

7941

Ein Beitrag zur Untersuchung der Biosynthese des Tryptophans in Saccharomyces cerevisiae

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Wolfgang Lück
aus Sensburg/Ostpreussen

1964

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juni 1964

D e k a n	: Prof. Dr. P.Roquette
1. Berichterstatter	: Doz. Dr. F.Lingens
2. Berichterstatter	: Prof. Dr. Dr. G.Weitzel

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Die vorliegende Arbeit wurde auf
Veranlassung und unter Anleitung von

Herrn Dozenten Dr. F. L i n g e n s

im Chemischen Institut der Universität
Tübingen durchgeführt.

Herrn Dozenten Dr. F. Lingens danke ich
sehr herzlich für die vielseitigen Anregungen,
die gewährte Freizügigkeit und die mir bei
der Arbeit erwiesene Unterstützung.

Dem Direktor des Chemischen Institutes
Herrn Professor Dr. Eugen Müller möchte
ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes
herzlich danken.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung Seite

Möglichkeiten zur Untersuchung von Biosynthesen bei Mikroorganismen. 11

Theoretischer Teil

Über die gemeinsamen Vorstufen der aromatischen Aminosäuren. 14

Die Bildung von Phenylalanin und Tyrosin. 15

Die Biosynthese des Tryptophans. 16

Über die Biosynthese des Tryptophans in Saccharomyces cerevisiae. 19

Untersuchungen mit Enzymextrakten aus verschiedenen Hefen und Hefemutanten. 21

Nachweis von extracellulärer Invertase bei Saccharomyces cerevisiae- und Neurospora crassa-Mutanten. 24

Über den Verzweigungspunkt in der Aromatenbiosynthese. 27

Zwei unbekannte Vorprodukte der Anthranilsäure. 28

Über die Eigenschaften des Akkumulates der S. cerevisiae-Mutante E 40. 28

Der Einfluß von analogen Verbindungen auf die Biosynthese. 29

Seite

Die Einwirkung von 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin auf die Aminübertragung. 31

Versuche zur Reindarsellung des Akkumulates der S. cerevisiae-Mutante E 40. 32

Die Perjodatoxydation des Akkumulates der S. cerevisiae-Mutante E 40. 35

Über die katalytische Hydrierung des Akkumulates der S. cerevisiae-Mutante E 40. 38

Die katalytische Disproportionierung des Akkumulates der S. cerevisiae-Mutante E 40. 39

E x p e r i m e n t e l l e r T e i l.

Allgemeines. 43

Verwendete Stämme. 43

Züchtung von Hefen. 44

Untersuchung des Akkumulates der Eddy'schen Hefe. 45

Die Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen bei S. cerevisiae-Mutante H 19. 46

Präparation der Darco-G-60-Aktivkohle. 47

Untersuchungen mit Enzymrohextrakten. 47

1.) Bereitung der Enzymextrakte. 47

2.) Reagentien zum Enteiweißen der Enzymlösung nach Somogyi. 48

3.) Durchführung der Anthranilsäure-Bestimmung. 48

Bestimmung der Invertaseaktivität. 49

Medium zur Züchtung von Neurospora crassa. .. 49

Mit 3,5-Dinitrosalicylsäure. 49

Polarimetrische Bestimmung der Invertase. ... 50

Drehwertbestimmung einiger Lösungen. 51

Seite

Die Gewinnung des Akkumulates der S. cerevisiae-Mutante E 40. 52

Stoffwechseln unter pH-Kontrolle. 52

Die Eigenschaften des Akkumulates der E 40..... 53

Hemmversuch mit 4-Methyl-DL-tryptophan und D-Tryptophan. 54

Über die Einwirkung von 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin auf verschiedene Hefemutanten. 54

Versuche zur Reindarstellung des Akkumulates der E 40. 55

Die Perjodatoxydation. 57

Fällung eines 2,4-Dinitrophenylhydrazons. 57

Untersuchung der Reaktion mit Triphenyltetrazoliumchlorid. 58

Die katalytische Hydrierung. 58

Die Ätherspaltung. 59

Darstellung der trans-3,4-Dihydroxycyclohexancarbonsäure. 59

1.) Δ^3-Tetrahydrobenzoesäure. 59

2.) trans-3,4-Dihydroxycyclohexancarbonsäure (1). 60

Die katalytische Disproportionierung. 61

Zusammenfassung 63

Literaturverzeichnis 65

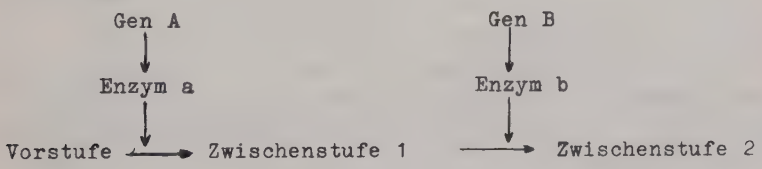
E i n l e i t u n g

Möglichkeiten zur Untersuchung von Biosynthesen.

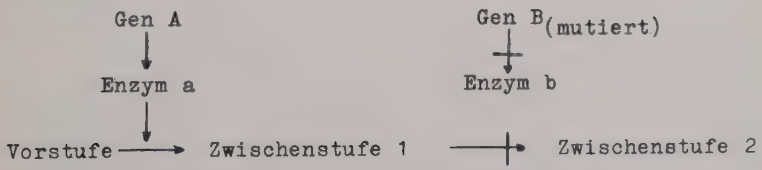
Die Biosynthesen der Aminosäuren, Purine, Pyrimidine und Vitamine verlaufen von einfachen Stoffen ausgehend über definierte Zwischenstufen. Jeder Syntheseschritt wird durch ein Enzym gesteuert. Die Zwischenstufen einer Synthesekette sind normalerweise nicht faßbar, da sie nur in geringer Konzentration auftreten.

Biochemische Mangelmutanten von Mikroorganismen sind geeignete Objekte zur Aufklärung solcher Syntheseketten. Mutationen treten in geringem Maße spontan auf. Eine Mutation läßt sich künstlich durch Röntgenstrahlen, UV-Strahlen oder durch chemische Agentien auslösen. Durch die Mutation eines Gens kann die Synthese eines Enzyms unterbunden werden, d.h. die Mutante ist nicht mehr zu allen biosynthetischen Leistungen befähigt.

Wildstamm:



Mutante:



Die Genmutation hat in diesem Falle zur Folge, daß der mutierte Stamm spezielle Nahrungsansprüche stellt und diese auch weitervererbt. Er kann nur wachsen, wenn im Medium ein Ergänzungsstoff enthalten ist. Diese Tatsache kann man auch benutzen, um mutmaßliche Folgeprodukte auf ihre wachstumsfördernde Eigenschaft zu untersuchen.

Die Zwischenstufe vor dem genetischen Block wird weiter hergestellt und, da sie nicht weiter verarbeitet wird, an das Medium abgegeben. Ein solches Akkumulat läßt sich aus dem Medium isolieren und mit analytischen Methoden identifizieren. Mit Hilfe zahlreicher Mutanten, die ihren genetischen Block an verschiedenen Stellen der Synthesekette eines Stoffes haben, kann man ganze Reaktionsfolgen aufklären. Erschwert wird die Untersuchung, wenn als Akkumulat nicht das eigentliche Zwischenprodukt der Biosynthese sondern ein Sekundärprodukt auftritt.

Enzymextrakte oder isolierte Enzyme, die einen einzigen Syntheseschritt katalysieren, sind ein weiteres Hilfsmittel zur Untersuchung einer Biosynthesekette. Die Enzyme erhält man durch Extraktion und Anreicherung aus der Wildform oder geeigneten Mutanten. Geeignet sind Mutanten, die im zu untersuchenden Syntheseschritt nicht blockiert sind. Die Synthese eines Zwischenproduktes kann so in vitro versucht werden.

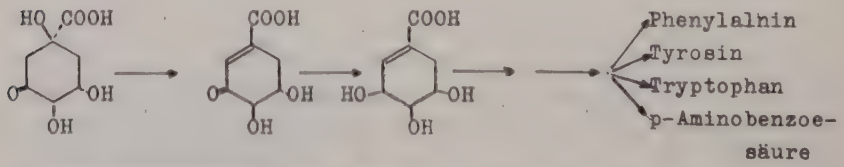
Auch mit Hilfe von Isotopen kann eine Biosynthesekette untersucht werden. Verbindungen mit stabilen oder radioaktiven Isotopen können im Fütterungstest oder im Enzymversuch herangezogen werden. Man ermittelt die Stellen der Markierung durch geeignete Abbaumethoden.

Theoretischer Teil

Über die gemeinsamen Vorstufen der aromatischen Aminosäuren.

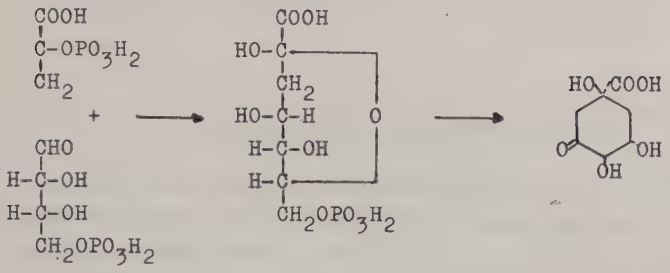
Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und p-Aminobenzoesäure entstehen aus einer Biosynthesekette gemeinsamer Vorstufen. Hinweis auf diese Tatsache gibt die Beobachtung von Einfachmutanten von Escherichia coli und Neurospora crassa, die erst bei gleichzeitiger Gabe aller vier Aminosäuren wachsen. Diese polyauxotrophen Mangelmutanten besitzen einen genetischen Block in der Synthese des Benzolringes. B.D. Davis (1) fand in der Shikimisäure (3,4,5-Trihydroxycyclohexen-1-carbonsäure) eine Substanz, die geeigneten Mutanten an Stelle von Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und p-Aminobenzoesäure das Wachstum ermöglicht, während andere Mutanten dieses Vorprodukt akkumulieren (2,3).

Als Vorstufe der Shikimisäure ist 5-Dehydroshikimisäure identifiziert worden (4), die nach Davis und Mingioli (5) aus 5-Dehydrochinasäure gebildet wird.



Durch Kondensation von D-Erythrose-4-phosphat und Phosphoenol-brenztraubensäure entsteht die 2-Keto-3-desoxy-D-arabo-heptonsäure-7-phosphorsäure, die nach Untersuchungen von Srinivasan, Katagiri und Sprinson (6) durch Cyclisierung

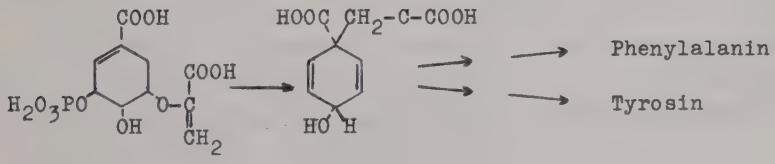
5-Dehydrochinasäure liefert.



Als Folgeprodukt der Shikimisäure fanden Davis und Mingioli (7) eine Verbindung, die "compound Z_1" genannt wird und von Levin und Sprinson (8) als 3-Enol-pyruvylshikimisäure-5-phosphat identifiziert wurde. Enzymextrakte aus E. coli-Mutanten können aus Shikimisäure-5-phosphat und Phospho-enolbrenztraubensäure "compound Z_1" bilden.

Die Bildung von Phenylalanin und Tyrosin.

Bei Phenylalanin-Mangelmutanten von E. coli wird als Akkumulat eine instabile Verbindung gebildet, deren Sekundärprodukt Phenylbrenztraubensäure ist (9). Die Phenylbrenztraubensäure ist andererseits ein Wachstumsfaktor für dieselbe Mutante (10). Das instabile Vorprodukt erhielt den Namen Prephensäure (11). Sie tritt auf in der Verzweigungsstelle der Synthesekette von Phenylalanin und Tyrosin.

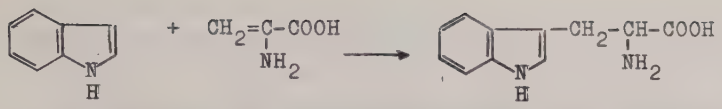


Die Prephensäure zeigt keine wachstumsfördernde Eigenschaft. Dies liegt vermutlich an der Undurchlässigkeit der Zellmembran für diesen Stoff.

Die Biosynthese des Tryptophans.

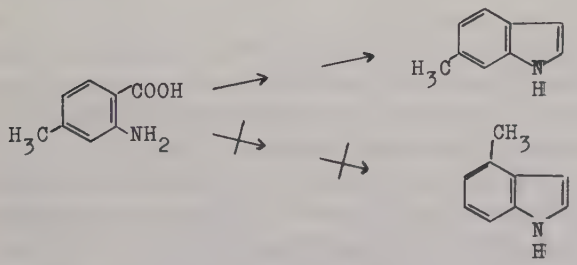
Die Biosynthese des Tryptophans ist eingehend untersucht. Als Vorstufe des Tryptophans beschreibt Fildes (12) bei Salmonella- und Corynebacterium das Indol. Snell (13) fand, daß Anthranilsäure und Indol im Wachstumstest bei Lactobacillus arabinosus wirksam sind, und postuliert auch Anthranilsäure als Vorprodukt. Dieselben Substanzen konnten später bei N. crassa- und E. coli-Mutanten als Akkumulat nachgewiesen werden (15).

Tatum und Bonner (14) erkannten, daß Tryptophan durch Kondensation von Indol mit Serin gebildet wird. Dieser Reaktionsschritt wird durch ein Enzym, das Pyridoxalphosphat als Cofaktor benötigt, katalysiert. Die Tryptophansynthetase konnte Yanofsky (16) anreichern und reinigen. Mit ihrer Hilfe untersuchten Tatum und Shemin (17) die Kondensation von Indol mit ^{15}N-α,β-Deuterioserin. Das bei diesem Versuch erhaltene Tryptophan enthielt kein α-Deuteriumatom. Daraus kann geschlossen werden, daß aus Serin durch intramolekulare Wasserabspaltung zunächst α-Aminoacrylsäure entsteht. Durch eine einer Michael-Addition entsprechenden Reaktion mit dem Indol wird das Tryptophan gebildet. Im biologischen Geschehen tritt dabei als Zwischenstufe eine Schiff'sche Base aus α-Aminoacrylsäure und Pyridoxalphosphat auf (18).



Die Umwandlung von Anthranilsäure in Indol wurde von Yanofsky näher untersucht. Mit ^{15}N-markierter Anthranilsäure gelang der Beweis, daß der Stickstoff der Anthranilsäure an der Bildung des Indolringes beteiligt ist (19). Versuche mit Carboxyl-^{14}C markierter Anthranilsäure zeigten, daß die Carboxylgruppe eliminiert wird (20).

Weiterhin zeigte Yanofsky (21), daß der Ringschluß über die 1-Stellung und nicht über die 3-Stellung der Anthranilsäure verläuft, da 4-Methylanthranilsäure nur zu 6-Methylindol umgesetzt wird. Bei einem Ringschluß über die 3-Stellung wäre 4-Methylindol entstanden. E. coli angebotenes Anilin wird nicht in Indol umgewandelt (22). Daraus muß geschlossen werden, daß Decarboxylierung und Ringschluß miteinander gekoppelt sind.

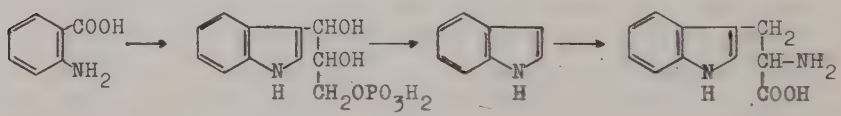


Für den Pyrrolring des Indols werden also zwei weitere C-Atome benötigt. Züchtungsversuche mit an den Kohlenstoffatomen C-1 und C-2 radioaktiv markierter Ribose und Glucose ergaben (23), daß die ersten beiden C-Atome der Zucker

die C-Atome 2 und 3 des Indolringes liefern. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß die Ringbildung über das N-Glycosid der Anthranilsäure erfolgt. Mit Enzymextrakten aus E. coli konnte Yanofsky (24) zeigen, daß die Bildung des Indols durch Zugabe von 1-Pyrophosphoryl-ribose-5-phosphat oder Adenosintriphosphat und Ribose bzw. Ribose-5-phosphat begünstigt wird.

Im Jahre 1957 fand F.Lingens (25) im Medium der Mutante try-3 von Salmonella typhimurium, deren genetischer Block zwischen Anthranilsäure und Indol liegt, Indol-3-glycerin. Die gleiche Verbindung war bereits früher (26) bei der Mangelmutante 7/8 von E. coli gefunden, aber nicht identifiziert worden.

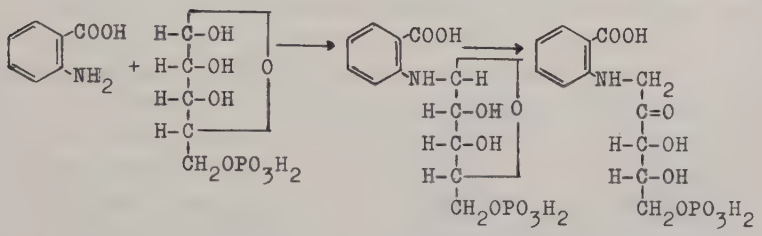
Yanofsky (27) stellte aus E. coli zwei Enzymfraktionen her, wovon die Fraktion A Anthranilsäure und 1-Pyrophosphoryl-ribose-5-phosphat in Indolyl-3-glycerinphosphat verwandelt und die Fraktion B das Indolyl-3-glycerinphosphat in Indol und Triosephosphat zerlegte. Damit ergibt sich folgende Synthesekette:



Weder Indolyl-3-glycerinphosphat noch Indol-3-glycerin waren bei entsprechenden Mutanten im Wachstumstest wirksam. Dies erklärt sich dadurch, daß Phosphorsäureester die Zellmembran nicht passieren können (33), während Indol-3-glycerin zwar aufgenommen, aber in der Zelle nicht rephosphoryliert werden kann. Dieses Phänomen ist auch bei der Untersuchung anderer Syntheseketten beobachtet worden. Phosphorylierte Zwischenprodukte werden von den Mutanten in entphosphorylierter Form abgegeben. Die phosphatfreien Verbindungen zeigen keine Wachstumswirkung.

Bei der Suche nach den fehlenden Gliedern der Synthesekette konnte im Medium zweier Aerobacter aerogenes-Mutanten

und dann auch bei E. coli eine Zucker-Anthranilsäure-Verbindung gefunden werden. Es handelte sich um die Amadori-Verbindung 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose (28,29).Yanofsky gelang die Herstellung des Phosphorsäureesters dieser Amadoriverbindung im Enzymversuch (30). Das Ribosylamin der Anthranilsäure ist bisher als Akkumulat nicht gefunden worden.

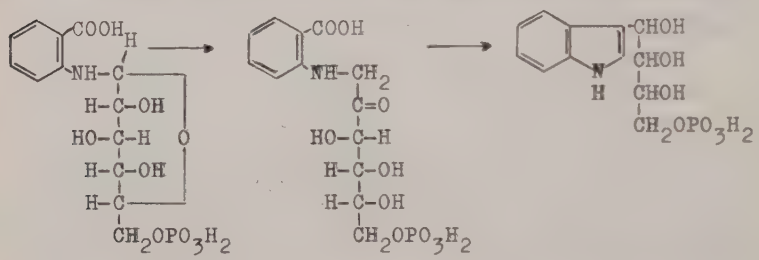


Über die Biosynthese des Tryptophans in Saccharomyces cerevisiae.

Die Biosynthese des Tryptophans in Enterobacteriaceen verläuft über 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose-5-phosphat, aus dem durch Cyclisierung unter Wasserabspaltung und Decarboxylierung 3-(Indolyl-[3])-glycerin-1-phosphat gebildet wird. Dieses wird in Indol und Glycerinaldehydphosphat gespalten. Das Indol ergibt dann mit der aus Serin gebildeten α-Aminoacrylsäure das Tryptophan.

Im Medium einer Tryptophan-Mangelmutante von Saccharomyces cerevisiae mit dem genetischen Block zwischen der Anthranilsäure und dem Indol wiesen Parks und Douglas als erste 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-fructose nach (31). Bei der Untersuchung der Akkumulate entsprechend blockierter Mangelmutanten von S. cerevisiae und N. crassa fand F.Lingens (32,34) ebenfalls diese Verbindung. Der Nachweis von

1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-fructose konnte durch die Synthese gesichert werden (35,36). Aus diesen Befunden ergab sich die Frage, ob bei S. cerevisiae und eventuell auch bei N. crassa ein anderer Weg bei der Biosynthese des Tryptophans beschritten wird, wobei neben dem 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-fructose-6-phosphat als weitere Zwischenprodukte N-(o-Carboxyphenyl)-glucosylamin-6-phosphat und 4-(Indolyl-3-erythrit-1-phosphat zu postulieren sind.



Von Eddy (37) ist ein auf die Zufuhr von Pyridoxalphosphat angewiesener Hefestamm beschrieben worden, der unter Pyridoxalphosphat-Mangelbedingungen verschiedene Tryptophanvorprodukte akkumuliert, unter denen sich auch eine unbekannte Indolverbindung befinden soll. In eigenen Versuchen konnte die von Eddy erwähnte indolartige Substanz nicht nachgewiesen werden.

Rhuland und Bard (38) fanden bei einem Lactobacillus arabinosus-Stamm eine mit Ehrlich's-Reagens reagierende Substanz, die nach dem UV-Spektrum Indolglycerin, aber auch Indolylerythrit, sein könnte.

Von einigen Autoren wird die Meinung vertreten (30,39), daß die 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-fructose ein Kunstprodukt sei. Man könnte annehmen, daß diese Verbindung aus Anthranilsäure und Glucose über das Glucosylamin durch Amadori-Umlagerung spontan entsteht.

Wie E.Schraven gezeigt hat (40), entsteht aus zugesetzter Anthranilsäure mit der Glucose des Mediums unabhängig

von lebenden Organismen tatsächlich diese Amadori-Verbindung.

Um diese Möglichkeit der spontanen Bildung auszuschließen, wurde die Tryptophanmangelmutante H 19 von S. cerevisiae nach Vorzüchtung im Komplettmedium in modifiziertes Minimalmedium gegeben. Als Kohlenstoffquelle kamen nacheinander Natriumacetat, Glycerin und Rohrzucker zur Anwendung. Nach 24 Stunden ergaben die Hefezellen im Natriumacetat enthaltenden Medium noch kein Akkumulat, was durch Beobachtung der Fluoreszenz unter der UV-Lampe kontrolliert werden kann. Im Parallelansatz mit Rohrzucker als Kohlenstoffquelle war eine starke Fluoreszenz erkennbar. Danach wurde zum Ansatz mit Natriumacetat steriles bidestilliertes Glycerin in das Medium gegeben. Auch mit Glycerin war nach weiteren 18 Stunden keine Fluoreszenz unter der UV-Lampe feststellbar. Obwohl die Hefezellen bereits längere Zeit in ungeeignetem Minimalmedium waren, trat 8 Stunden nach Zugabe von steriler Rohrzuckerlösung doch noch eine Fluoreszenz unter der UV-Lampe auf, d.h. die Hefezellen lebten noch und bildeten ein fluoreszierendes Akkumulat.

Mit diesem Versuch kann die Frage, ob die 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-fructose ein Kunstprodukt sei, nicht entschieden werden, da nur mit Zucker als Kohlenstoffquelle die Hefen ein Akkumulat bilden.

Untersuchungen mit Enzymextrakten aus verschiedenen Hefen und Hefemutanten.

Zur Klärung der Frage, ob das Fructosederivat der Anthranilsäure ein echtes Zwischenprodukt in der Tryptophanbiosynthese in S. cerevisiae darstellt, wurden aus verschiedenen Hefen und Hefemutanten Enzymextrakte hergestellt.

Die Hefezellen wurden dabei in Phosphatpuffer pH 6,5 bzw.

pH 7,8 bei 0^{o} mit dem Gerät nach Zillig und Hölzel (41) mechanisch aufgeschlossen. Der Enzymextrakt wurde durch Zentrifugation bei 45 000 x g von den Zellrückständen befreit. Die Inkubationsansätze enthielten Enzymrohextrakt, Anthranilsäure, Magnesiumsulfat, Adenosintriphosphat, Phosphatpuffer und Glucose-6-phosphat bzw. Ribose-5-phosphat. Die Abnahme der Anthranilsäure sollte nach Extraktion des angesäuerten Inkubationsansatzes mit Essigester fluorometrisch verfolgt werden. Smith (30) extrahierte zwei- bis dreimal mit Essigester nach Ansäuern mit Citratpuffer pH 4,5. Da bei eigenen Versuchen die Extraktion nicht vollständig gelang und unterschiedliche Mengen Anthranilsäure in der wäßrigen Phase blieben, bestimmte ich die Anthranilsäure fluorometrisch direkt im Ansatz nach Entfernung des Eiweißes (42,43).

Die ersten Inkubationsversuche ergaben kein brauchbares Ergebnis, d.h. es konnte bei keinem Ansatz eine Abnahme der Anthranilsäure festgestellt werden. Smith führte die entsprechenden Versuche mit E. coli-Extrakten bei pH 7,8 durch. Da für diese Enzyme ein pH-Optimum von 7,8 - 8,0 festgestellt worden war, hielt auch ich in den ersten Versuchen diesen pH-Wert ein. Es zeigte sich aber, daß bei Hefen das Optimum mehr in den sauren Bereich verschoben ist. Hefen säuern beim Wachstum das Medium, und ein gutes Wachstum ist noch unterhalb von pH 6,0 festzustellen. Bei pH 6,5 konnte eine Abnahme der Anthranilsäure beobachtet werden (Tab.1). Erst nach 20 Stunden tritt auch beim Ansatz mit Glucose-6-phosphat eine Abnahme der Anthranilsäure auf. Hierbei kann Glucose-6-phosphat inzwischen umgewandelt worden sein; es wurden ja nur Enzymrohextrakte verwendet.

Tab.1 Anthranilsäure-Bestimmung nach Enteiweißung. Die Werte sind in Skalenteilen am Zeiss-Fluorometer (ZFM4/PMQ2) angegeben. 10 Skalenteile = 0,61 µg Anthranilsäure/ml = 4,45 nMol/ml.

Ansatz		1.Vers.	2.Vers.		3.Vers.
Zucker	Enzym	20 Min.	90 Min.	20 Stdn.	90 Min.
Ribose-5-ph.	-	100	100	90,8	100
Gluc.-6-ph.	-	101,3	98,2	93,7	103,1
Ribose-5-ph.	+	92,2	64,5	75,3	65,5
Gluc.-6-ph.	+	99,7	92,3	76,0	94,7
--	+	-	-	-	94,5

Aus diesen Versuchen kann geschlossen werden, daß der Tryptophan-Biosyntheseweg in Enterobacteriaceen auch für S. cerevisiae Gültigkeit hat.

Nachweis von extracellulärer Invertase bei S. cerevisiae- und N. crassa-Mutanten.

Die Frage, wie die Bildung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-fructose zu erklären ist, die ja einwandfrei nachgewiesen werden konnte, mußte nun geklärt werden. Bei der Züchtung der S. cerevisiae-Mutanten diente als Kohlenstoffquelle Rohrzucker. Mit Hilfe dieses Zuckers mußte auf irgendeinem Wege die Amadori-Verbindung gebildet werden.

Bei der Isolierung von Amadori-Verbindungen war früher schon (44) beobachtet worden, daß freie Fructose auftrat. Man könnte zunächst daran denken, daß diese durch Zerfall der sehr labilen Amadori-Verbindung entstanden wäre (36). Bisher ist es aber noch nie gelungen, durch die Spaltung einer Amadori-Verbindung die zugehörige Ketose zu gewinnen (45,36). Als einzige Möglichkeit blieb noch offen, daß der Rohrzucker im Medium zunächst in Glucose und Fructose gespalten würde. Aus der akkumulierten Anthranilsäure könnte dann mit Glucose zuerst spontan das Glucosylamin und daraus die Amadori-Verbindung entstehen, und Fructose bliebe in freier Form im Medium.

Diese Möglichkeit war zunächst außer acht gelassen worden, da nach den Untersuchungen von Micheel und Schleppinghoff (46) die Amadori-Umlagerung beim Anthranilsäure-Glucosylamin nicht möglich sein sollte.

Bei Versuchen zur Synthese von Amadori-Verbindungen der ungünstig substituierten Anthranilsäure stellte es sich aber heraus, daß die Umlagerung relativ leicht und in guter Ausbeute verläuft (36). Erst durch nachträgliche Zersetzung der labilen Amadori-Verbindung wird die Ausbeute verringert.

Die Spaltung des Rohrzuckers in Fructose und Glucose im Medium könnte durch eine extracelluläre Invertase erfolgen.

Zum Nachweis von Invertase im Medium verschiedener S. cerevisiae- und N. crassa-Mutanten wurden Proben des Mediums zu Rohrzuckerlösung gegeben. Nach kurzer Einwirkung konnte Invertzucker kolorimetrisch durch Umsetzung mit 3,5-Dinitrosalicylsäure nachgewiesen werden (47). Aus diesen Versuchen ergab sich, daß alle Mutanten bei Züchtung im rohrzuckerhaltigen Medium extracelluläre Invertase bilden. In Gegenwart von Glucose entsteht weniger Invertase, und bei Zusatz von Fructose oder Galactose ließ sich keine Invertase nachweisen.

Tab.2 Bestimmung der Invertaseaktivität.
Invertaseeinheit: bei 20° und pH 4,5 in 5 Minuten gebildeter Invertzucker in mg.

Mutanten	C-Quelle	Invertase-Einheiten
S. cerevisiae Mutante H 19	Rohrzucker	18,8
	Glucose	9,9
	Fructose	0
	Galactose	0
N. crassa 167	Rohrzucker	52,8
N. crassa 9683	Rohrzucker	18,7
N. crassa 81	Rohrzucker	12,7
N. crassa 167	Fructose	0

Auch durch die Änderung des spezifischen Drehwertes kann Invertase bestimmt werden (48). Mit dieser Methode konnte ebenfalls Invertase bei Hefe- und einer N. crassa-Mutante erfaßt werden.

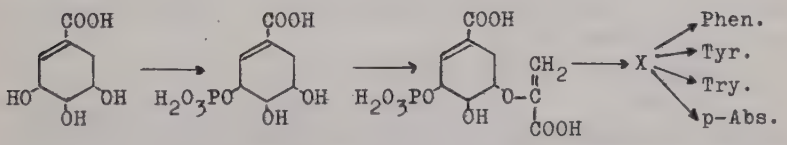
Tab.3 Polarimetrische Bestimmung von Invertase

	$\bar{\alpha}^{c}$	$[\alpha]_{D}^{20}$
Invertzucker n. Lit. (49)	-	$-19,7^{o}$
Rohrzuckerlösung 2 %	2,58	$64,5^{o}$
Minimalmedium f. Hefen vor Stoffwechseln (1 % Rohrzucker)	1,30	$65,0^{o}$
Minimalmedium f. Hefen nach Stoffwechseln v. S. cerevisiae NCYC 77	-0,86	$-18,7^{o}$
Minimalmedium f. N. crassa vor Stoffwechs. (2 % Rohrzucker)	2,68	$67,0^{o}$
Minimalmedium f. N. crassa nach Stoffwechs. v. N. crassa 81	-0,71	$-17,7^{o}$
Minimalmedium f. N. crassa nach Säurehydrolyse	-0,70	$-17,5^{o}$

Wickerham und Dworschak (50) haben bei S. cerevisiae-Wildstämmen Invertase in der gleichen Größenordnung nachgewiesen. Metzenberg (51) erwähnt in einer kürzlich erschienenen Arbeit eine N. crassa-Mutante, die unter gleichen Bedingungen größere Mengen Invertase und Trehalase als der Wildstamm produziert. Er stellte ferner fest, daß die Enzymaktivität von der Art der Kohlenstoffquelle abhängig ist. Demnach begünstigt Galactose die Invertasebildung (im Gegensatz zu eigenen Befunden bei der S. cerevisiae-Mutante H 19), während Glucose und besonders Fructose diese unterdrücken.

Über den Verzweigungspunkt in der Aromatenbiosynthese.

Über die Verzweigungsstelle, die vom gemeinsamen Syntheseweg der Aromaten zu den einzelnen Aminosäuren führt, besteht wenig Klarheit. Levin und Sprinson (8) wandelten mit Extrakten aus einer Phenylalanin-Mangelmutante von E. coli Shikimisäure-5-phosphat in Compound Z_1 um. Da Srinivasan andererseits mit dem Extrakt einer E. coli-Mutante Shikimisäure-5-phosphat in Gegenwart von L-Glutamin in Anthranilsäure (52) und durch Bäckerhefe-Extrakt in p-Aminobenzoesäure (53) umwandeln konnte, wurde Shikimisäure-5-phosphat von einigen Autoren als Produkt des Verzweigungspunktes angenommen. Das 3-Enolpyruvyl-shikimisäure-5-phosphat bezeichnet Sprinson (54) als Vorprodukt der Prephensäure. Davis und Mingioli konnten jedoch Shikimisäure-5-phosphat im Medium einiger p o l y a u x o t r o p h e r Mutanten nachweisen. Das Verzweigungsprodukt in einer Biosynthesekette darf aber nicht als Akkumulat von polyauxotrophen Mutanten auftreten, sondern kann nur das Akkumulat der entsprechenden Einfachmutanten sein. Es ist also folgende Reaktionskette anzunehmen:



Z_1

Zwei unbekannte Vorprodukte der Anthranilsäure.

Biochemische Vorprodukte der Anthranilsäure sind bisher nicht beschrieben worden. Bei der Austestung einer größeren Anzahl von Mutanten von S. cerevisiae konnten zwei Tryptophan-Mangelmutanten (E 40 und DX 12) mit einem genetischen Block vor der Anthranilsäure isoliert werden. Beide Mutanten wachsen wahlweise mit Tryptophan, Indol und Anthranilsäure und bilden zwei nach dem UV-Spektrum verschiedene Akkumulate. Die Reihenfolge ihrer genetischen Blockierung konnte durch den Kreuzfütterungstest infolge Unwirksamkeit ihrer Akkumulate nicht festgelegt werden. Dies läßt vermuten, daß die Akkumulate die Zellwand nicht wieder passieren können oder Sekundärprodukte des echten Zwischenproduktes sind.

Über die Eigenschaften des Akkumulates der Mutante E 40.

Das Akkumulat der Mutante E 40 läßt sich aus dem Minimalmedium am besten durch Extraktion mit Essigester isolieren. Hierbei geht in den Essigester eine UV-aktive Substanz mit folgenden Maxima:

in Methanol: 224 nm und 276 nm
in Wasser : 224 nm und 274 nm.

In saurer und alkalischer Lösung tritt keine Verschiebung der UV-Maxima ein.

Im Papierchromatogramm im Laufsystem Methanol/Wasser (1:1) auf dem Papier von Macherey & Nagel Nr. 260 ff ist beim R_F-Wert von 0,80 die Substanz mit den obigen UV-Maxima zu finden. Die Untersuchung mit Sprühreagentien führt zu

folgenden Ergebnissen:

		Nachweis für:
Ehrlich's-Reagens	negativ	Indol u. ä.
Triphenyltetrazolium-chlorid (kalt)	positiv	reduz. Substanzen
2,6-Dichlorphenol-indophenol	negativ	reduz. Substanzen
Anilinphthalat	negativ	Zucker
Ninhydrin	negativ	Aminosäuren
Phenitrazol	negativ	Phenole
Eisen-3-chlorid	negativ	Phenole
Tetracyanoäthylen	negativ	Aromaten
Tetranitromethan	negativ	Aromaten
Bromkresolpurpur	positiv	Säuren
Rhodamin B	positiv	Säuren
Glucose/Phosphorsäure	negativ	aromat. Amine
Arnow's-Reagens	negativ	o-Diphenole
Perjodat/Benzidin	positiv	1,2-Diole u. ä.

Aus diesen Untersuchungen ist zu entnehmen, daß die Substanz

1.) eine Carbonsäure ist,
2.) keine aromatische Struktur besitzt,
3.) eine 1,2-Diol-gruppierung enthält.

Der Einfluß von analogen Verbindungen auf die Biosynthese.

Die biologische Regulation in einer Biosynthesekette wird durch zwei Mechanismen bewirkt.

1.) durch die Kontrolle der Enzymsynthese durch Repression und Induktion

und 2.) durch die Kontrolle der Enzymaktivität durch die Endprodukt-hemmung (feedback inhibition oder Rückkopplungshemmung).

Monod und Cohen-Bazire fanden 1953, daß die Synthese der Tryptophan-synthetase durch das Tryptophan gehemmt wird (57). Vogel führte für diese allgemein beobachtete spezifische Hemmung der Enzymsynthese durch das Produkt der Enzymreaktion den Namen "Repression" ein (58).

Das Endprodukt einer biochemischen Reaktionskette hemmt die Aktivität des Enzyms, das die erste Reaktion in dieser spezifischen Synthesekette katalysiert, und verhindert so eine Überproduktion.

Ferner wurde jedoch festgestellt, daß analoge Verbindungen bei der Regulation den normalen Metaboliten nachahmen können. So fanden Gots und Gollub (59), daß nicht nur die natürlichen Purine, sondern auch verschiedene ihrer Analogen die Absonderung eines Zwischenproduktes der Purinbiosynthese bei Purin-Mangelmutanten unterdrücken. Ähnliches fanden andere Autoren bei Azatryptophan (60), 4-Methyltryptophan (61) und Histidinanalogen (62). Moyed bezeichnet dies Phänomem als "false feedback inhibition" (falsche Rückkopplungshemmung) (63).

Bei der Zugabe von 4-Methyl-DL-tryptophan zum Minimalmedium der Mutanten E 40, DX 12 und E 107 (die Mutante E 107 akkumuliert Anthranilsäure) unter Akkumulationsbedingungen ist erst bei Gaben von 200 γ/ml kein Akkumulat mehr nachweisbar. Dagegen wirkten sich 20 γ/ml D-Tryptophan und 20 γ/ml 4-Methyltryptophan nur auf die Menge der Akkumulate aus. 20 γ/ml der Substanzen ist jedoch das hundertfache der Menge, die bei einer Salmonella typhimurium-Mutante bereits vollständige Hemmung der Indolakkumulation bewirkt (64). Offensichtlich werden bei Hefemutanten, die ja auch größere Mengen an Akkumulat liefern, größere Hemmstoffmengen benötigt.

Aus diesen Versuchen läßt sich ableiten, daß die Akkumu-

late der E 40 und DX 12, und selbstverständlich auch der E 107, im Zusammenhang mit der Tryptophansynthese gebildet werden, da ihre Bildung ja durch Tryptophanbiosynthesehemmstoffe unterdrückt wird.

Die Einwirkung von 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin auf die Aminübertragung.

Srinivasan fand 1959 (52), daß im Enzymversuch die Anthranilsäure aus Shikimisäure-5-phosphat gebildet wird, wobei sich L-Glutamin als der beste Amindonator erwies. Hierbei wird der Amidstickstoff des Glutamins übertragen.

Auch bei der Biosynthese der Purine tritt bei der Umwandlung des Formylglycin-ribotids in das Formylamidin-ribotid L-Glutamin als Amindonator auf. Buchanan et al. (65) stellten im Enzymversuch fest, daß die strukturell sehr ähnlich gebauten Antibiotika Azaserin (66) und 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin (67) die Amidgruppenübertragung des Glutamins hemmen. Dabei zeigte das Diazo-oxo-norleucin eine wesentlich stärkere Wirkung als das Azaserin.

Die Einwirkung von Azaserin auf drei E. coli-Stämme beschreiben Kaplan und Mitarbeiter (68). Sie fanden, daß die Wirkung des Azaserins partiell durch Tryptophan, wie auch durch die anderen aromatischen Aminosäuren, aufgehoben wird, während die Vorprodukte des Tryptophans Indol und Anthranilsäure keinen Effekt zeigen. Die Autoren haben nicht den Einfluß dieses Antibiotikums auf die Akkumulate beschrieben.

In eigenen Versuchen wurde die Einwirkung des nach F.Weygand synthetisierten Diazo-oxo-norleucins (69) auf die Akkumulate der S. cerevisiae-Mutanten E 40, DX 12 und E 107 untersucht. Es wurden 20 γ/ml Diazo-oxo-norleucin in das Minimalmedium gegeben. Die Akkumulatbildung wurde durch das UV-Spektrum des Überstandes kontrolliert. Bei der Mutante

E 107 kann die Bildung der Anthranilsäure durch die Fluoreszenz unter der UV-Lampe beobachtet werden. Die Einwirkung des Diazo-oxo-norleucin auf die stoffwechselnden Zellen hatte zur Folge, daß die Mutante E 107 und DX 12 nicht mehr ihr Akkumulat bilden, während das Akkumulat der E 40 nicht beeinflußt wird. Die weitere Untersuchung der Akkumulate ergab, daß die Mutanten E 107 und DX 12 bei der Einwirkung von Diazo-oxo-norleucin den selben Stoff wie die Mutante E 40 akkumulieren. Aus diesen Versuchen ergibt sich, da die Mutante DX 12 vor der Anthranilsäure blockiert ist, folgende Reihenfolge:

E 40 ⟶ DX 12 ⟶ E 107 .

Es ließ sich auch weiterhin zeigen, daß das Akkumulat der Mutante E 40 unabhängig vom Stickstoff-stoffwechsel gebildet wird. Das unveränderte Akkumulat wird nämlich auch unter Stickstoffmangelbedingungen gebildet.

Versuche zur Reindarstellung des Akkumulates der S. cerevisiae-Mutante E 40.

Bei der Extraktion des Minimalmediums der S. cerevisiae-Mutante E 40 mit Essigester ist in der organischen Phase eine rote Fluoreszenz unter der UV-Lampe zu beobachten. Das anschließende Ausschütteln des Essigesters mit destilliertem Wasser führt zur Abtrennung des Akkumulates von der rotfluoreszierenden Substanz, die im Essigester verbleibt. In der wäßrigen Phase sind neben dem Akkumulat noch einige Verunreinigungen, die das UV-Spektrum jedoch nicht stören, enthalten.

Die rot-fluoreszierende Substanz ist mit verdünnter Salzsäure aus dem Essigester extrahierbar. Die UV-Maxima dieser Substanz liegen bei 391 nm und 288 nm. Das Maximum bei

391 nm hat eine wesentlich höhere Extinktion und wird durch Alkali nach 405 nm verschoben. Durch Säure tritt keine Verschiebung der UV-Maxima ein. Bisher konnte die Struktur dieser Substanz nicht aufgeklärt werden, da sie bei der Chromatographie in verschiedenen Laufsystemen am Startfleck bleibt und mit allen üblichen Nachweisreagenzien nicht reagiert.

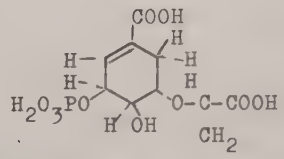
Beim Züchten von Hefen tritt Säuerung des Mediums ein. Es wird ein pH-Wert von etwa 4 - 5 beobachtet. Da durch diese Säuerung eventuell eine chemische Veränderung des Akkumulates auftreten kann, wurde die Mutante E 40 auch einmal bei konstantem pH gezüchtet. Das Akkumulat der Mutante E 40 und auch die rot-fluoreszierende Substanz konnte aber nach Stoffwechseln bei pH 7,0 nicht isoliert werden. Bei diesem Versuch wurden die vorgezüchteten Zellen in steriles Minimalmedium gebracht, das mit 1 n NaOH automatisch bei pH 7,0 gehalten wurde. Nach 72 Stunden wurde das Medium wie oben beschrieben aufgearbeitet und untersucht. Es ließ sich überhaupt kein Akkumulat nachweisen.

Die Reindarstellung des sehr instabilen, unbekannten Akkumulates wurde auf verschiedene Art versucht. Durch Extraktion war keine vollständige Reinigung möglich, da die Verunreinigungen ebenfalls extrahiert wurden. Die Fällung der Carbonsäure als Barium- oder Zink-salz ist möglich. Jedoch liefern die Schwermetallsalze von organischen Säuren erfahrungsgemäß keine brauchbaren Analysen. Bei der Rückgewinnung der freien Säure aus diesen Salzen trat Zersetzung ein.

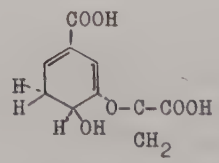
Die S-Benzyl-isothiuroniumsalze von Carbonsäuren zeichnen sich im allgemeinen durch gute Analysenergebnisse aus. Vom Akkumulat konnte nur schwer das S-Benzyl-isothiuroniumsalz erhalten werden, das infolge seiner guten Löslichkeit in allen untersuchten Lösungsmitteln nicht umkristallisiert werden konnte.

Beim Versuch, das Akkumulat durch Hochvakuum-sublimation bzw. -destillation zu reinigen, trat Zersetzung ein. Als

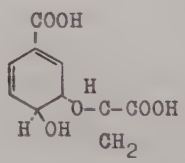
Zersetzungsprodukte wurden Phenol und Brenztraubensäure gefunden. Wie ist nun die Bildung dieser Produkte zu erklären? Das letzte bekannte Vorprodukt in der Synthesekette ist "Compound Z_1".



Nach dem UV-Maximum bei 274 nm kann im Ring eine zweite Doppelbindung angenommen werden. Plieninger fand z.B. für die 3,4-Dihydrobenzoesäure in Methanol ein UV-Maximum bei 276 nm (81), während für die 2,3-Dihydro-3-hydroxyanthranilsäure in 0,1 n HCl ein UV-Maximum bei 278 nm gefunden worden war (73). Andererseits soll jedoch auf Grund der Spaltbarkeit durch Perjodat eine 1,2-Diolgruppierung erhalten bleiben. Da bei der Zersetzung Brenztraubensäure entstand, muß bei der Umwandlung der "Compound Z_1" in das Vorprodukt der Anthranilsäure Phosphorsäure eliminiert worden sein. Die neue Doppelbindung im Ring kann jedoch nicht zwischen den C-Atomen 4 und 5 liegen, da dies eine enolisierbare OH-Gruppe zur Folge haben müßte. Das UV-Spektrum bei Zugabe von Alkali zeigte aber keine Enolverschiebung. Damit standen folgende zwei Strukturen zur weiteren Diskussion:



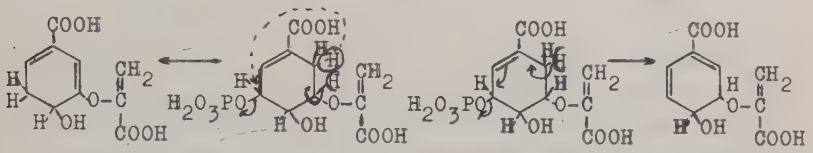
I



II

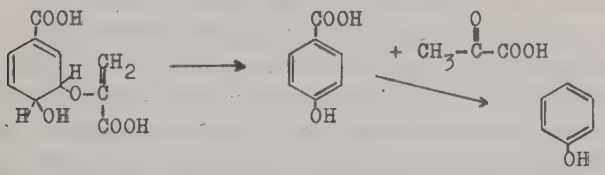
Für die Ausbildung der Formel I muß bei der Phosphorsäure-

eliminierung eine Hydrid-ionenwanderung eingetreten sein, während für die Formel II eine Elektronenpaarverschiebung unter Abspaltung eines Protons angenommen werden muß.



Formel I Formel II

Aus beiden Formeln kann durch Enol-ätherspaltung die Brenztraubensäure unter gleichzeitiger Aromatisierung abgespalten werden, wobei p-Hydroxybenzoesäure entsteht. Die p-Hydroxybenzoesäure neigt beim Erhitzen zur Decarboxylierung. So kann die Entstehung des Phenols erklärt werden.

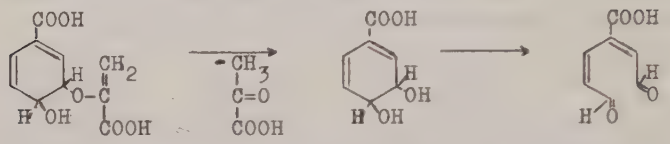


Bei der Hochvakuumbehandlung des mit Diazomethan hergestellten Methylesters der Substanz wurde nach dem UV-Spektrum ein Gemisch von Substanzen erhalten, die nicht identifiziert bzw. zugeordnet werden konnten.

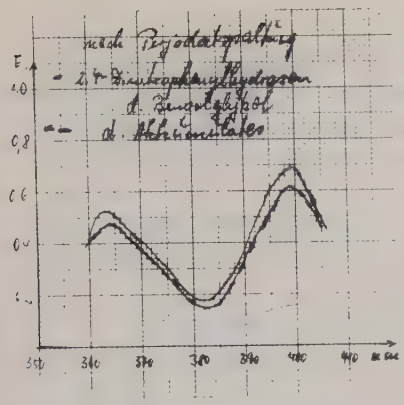
Die Perjodatoxydation des Akkumulates der S. cerevisiae-Mutante E 40.

Das Akkumulat der S. cerevisiae-Mutante E 40 ist, wie schon erwähnt, durch Perjodat spaltbar. Es galt nun festzustellen, welche Spaltprodukte hierbei entstehen. Für die Perjodatspaltung der Formel II (s.S. 34) zum Beispiel kann

folgender Reaktionsablauf angenommen werden:



Im Versuch wurde die Oxydation unter UV-Kontrolle durchgeführt. Die Lösung des Akkumulates wurde mit Kaliumperjodat versetzt und 8 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Hierbei trat langsam eine Verschiebung des UV-Maximums bei 274 nm zu kürzeren Wellenlängen ein. Nach Ablauf der Zeit lag das Maximum bei 268 - 270 nm. - Nakajima (74) fand bei der Perjodatoxydation des Benzolglykols (o-Dihydroxy-dihydrobenzol) dem Mucondialdehyd entsprechend ein UV-Maximum bei 270 nm. - Der Überschuß an Kaliumperjodat und das entstandene Jodat wurden nach Ansäuern durch Fällung mit Bariumchlorid beseitigt (73), der Niederschlag abzentrifugiert und abfiltriert. Die wäßrige Lösung wurde am Rundlaufverdampfer eingeengt, der Rückstand in Äthanol aufgenommen und mit 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung versetzt. Nach Abkühlen und Anreiben entstand ein gelb-roter Niederschlag, der wie erwartet aus zwei 2,4-Dinitrophenylhydrazonen bestand. So war bei der Papierchromatographie im System n-Butanol/Äthanol/0,5 n NH_4OH (7:2:1) mit den R_F-Werten 0,58 und 0,70 das 2,4-Dinitrophenylhydrazon der Brenztraubensäure und ein zweites Hydrazon an der Lösungsmittelfront zu finden. Das UV-Maximum des schneller wandernden 2,4-Dinitrophenylhydrazons in Äthanol lag bei 399 nm und stimmte mit dem des bis-2,4-Dinitrophenylhydrazons des Mucondialdehydes, der aus Benzolglykol durch Perjodatoxydation erhalten wurde, überein. Auch die charakteristische violett-blaue Farbe in alkoholischer Natronlauge weist auf das bis-2,4-Dinitrophenylhydrazon eines Mucondialdehydes hin. Die Extrahierbarkeit des zweiten



2,4-Dinitrophenylhydrazons aus Essigester mit wäßriger Natriumhydrogenkarbonatlösung bewies, daß es ebenfalls ein saures Hydrazon ist.

Das 2,4-Dinitrophenylhydrazon der Brenztraubensäure wurde auch erhalten, wenn man die äthanolische Lösung des Akkumulates mit der sauren 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung erhitzte.

Aus diesen Befunden kann entnommen werden:

1. der Brenztraubensäurerest ist leicht abspaltbar, was auf eine Enol-ätherstruktur hinweist (71);
2. das Akkumulat der Mutante E 40 ist eine Cyclohexadien-α,ß-diolverbindung. Da die Konjugation nach der Perjodatspaltung erhalten bleibt, stehen die Alkoholgruppen nicht an einem Doppelbindungs-C-atom.

Damit ist die Formel I (s.S. 34) auszuschließen.

Das Akkumulat der E 40 läßt sich, wie schon oben erwähnt, bequem durch die Reaktion mit alkalischer Triphenyltetrazoliumchloridlösung in der Kälte nachweisen. Unklar bleibt dabei, worauf diese Reaktion beruht. Man sollte dabei Bildung von Protocatechusäure-3-brenztraubensäure-enoläther erwarten. Bei einem Versuch mit dem Ziel, nach Ätherspaltung Protocatechusäure nachzuweisen, konnte aber diese Verbindung nicht gefunden werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß auch Benzolglykol in der Kälte mit Triphenyltetrazoliumchlorid reagiert. Es ließ sich allerdings weiterhin feststellen, daß Protocatechusäure und Brenzkatechin mit Triphenyltetrazoliumchlorid reagieren.

Bei diesem Stand der Untersuchung erschien eine Mitteilung von F.Gibson (72). Er fand bei einer in der Aromatenbiosynthese dreifach blockierten Mutante von E. coli ebenfalls

eine Substanz mit einem UV-Maximum bei 272 nm, der er in der Annahme, daß es das Verzweigungsprodukt ist, den Namen "Chorismінsäure" gab. Aus den in der Hauptsache NMR-spektroskopischen Daten schließt er auf die in der Formel II (s.S. 34) angegebene Struktur.

Über die katalytische Hydrierung des Akkumulates der S. cerevisiae-Mutante E 40.

Die bisher beschriebenen Versuche hatten die Struktur der Formel II für das Akkumulat sehr wahrscheinlich gemacht. Das Ziel der weiteren Untersuchung war die Umwandlung bzw. der Abbau des Moleküls zu einer bekannten und durch Synthese zugänglichen Verbindung.

Bei der katalytischen Hydrierung ist aus dem Akkumulat eine 3,4-disubstituierte Cyclohexancarbonsäure zu erwarten. Nach Untersuchungen von Grewe und Mitarbeitern (75) kann man 3,4-disubstituierte Cyclohexancarbonsäuren aus der Δ^3-Tetrahydrobenzoesäure erhalten. Diese ist wiederum gut durch Diels-Alder-Synthese aus Butadien und Acrylsäure zugänglich (76). Die trans-Anlagerung zweier Hydroxygruppen an eine Doppelbindung ist bequem durch Perameisensäure zu erreichen (78). Auf diesem Weg ist die 4-cis,3-trans-Dihydroxy-cyclohexancarbonsäure hergestellt worden.

Im letzten Jahr ist eine schonende und elegante Methode der Ätherspaltung (79) entwickelt worden, wobei die entsprechenden Alkohole zurückerhalten werden. Bei dieser Methode wird der Äther in Acetanhydrid mit Bortrifluoridätherat in Gegenwart von Lithiumbromid bei Zimmertemperatur vollständig gespalten.

Die Hydrierung des Akkumulates gelang mit Platin/Wasserstoff in Methanol. Das Hydrierungsprodukt des Akkumulates

ist nach der angeführten Methode der Ätherspaltung unterworfen worden. Durch Papierchromatographie konnten als Spaltprodukte Milchsäure und trans-3,4-Dihydroxy-cyclohexancarbonsäure nachgewiesen werden.

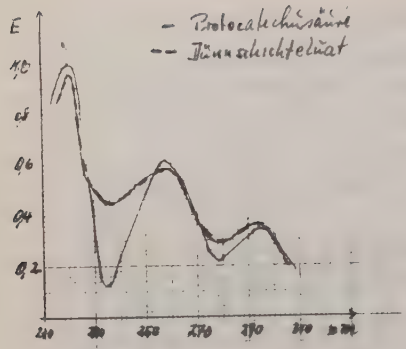
Papierchromatographie in "Partridge"-Gemisch (Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1).

	aufsteigend R_F		Ring R_F	
Substanz n.Ätherspaltung	0,60	0,81	0,65	0,78
trans-3,4-Dihydroxy-cyclohexancarbonsäure		0,81		0,78
Milchsäure	0,60		0,65	

Die katalytische Disproportionierung des Akkumulates der S. cerevisiae-Mutante E 40.

Ungesättigte Verbindungen wie das Cyclohexadien gehen in Gegenwart von Platin- bzw. Palladiumkatalysator schon bei relativ tiefen Temperaturen in das Gemisch des aromatischen und des vollständig gesättigten Kohlenwasserstoffs über (77).

Das Akkumulat der Mutante E 40 sollte durch diese Disproportionierung in eine substituierte Protocatechusäure übergehen. Es wurde die wäßrige Lösung der Substanz direkt oder nach Neutralisation mit 10% Pd auf Aktivkohle 2-3 Stunden am Rückfluß gekocht. Nach Abkühlen wurde vom Katalysator abfiltriert, die Aktivkohle mit Methanol-Ammoniak eluiert und die Lösung zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in 2 n HCl aufgenommen und 10 Minuten auf 100° erhitzt, um den Enoläther zu spalten. Die so erhaltene Substanz wurde durch UV-Spektroskopie und Papier- bzw. Dünnschichtchromatographie



untersucht. Es zeigte sich, daß im nicht neutralisierten Ansatz in größerer Menge p-Hydroxybenzoesäure entstanden war, im neutralisierten Ansatz trat hingegen ein Protocatechusäurederivat auf. Durch Dünnschichtchromatographie konnte aus dem Gemisch die Protocatechusäure isoliert (R_F 0,69) und durch das UV-Spektrum identifiziert werden. In alkalischer methanolischer Lösung trat auch die charakteristische Verschiebung der UV-Maxima ein.

Das Ergebnis der Papier- und Dünnschichtchromatographie war:

	20% KCl in H_2O	n-BuOH H_2O ges.	Kieselgel G Benzol/ MeOH/Eisessig(90:16:8)
Substanz	0,41 0,59 0,75 0,87	0,58	0,52 0,69 0,85 0,90
Protocatechusäure	0,75	0,59	0,69
p-Hydroxybenzoesäure	0,59	---	0,85
Brenztraubensäure	0,42 0,88	---	0,53 0,90

Die Annahme, daß durch Säurebehandlung des Akkumulates der E 40 nur eine bekannte Verbindung entstehen würde, konnte durch den Versuch nicht bestätigt werden. In dem entstandenen Substanzgemisch konnten durch Papierchromatographie Brenztraubensäure und p-Hydroxybenzoesäure nachgewiesen und zwei weitere UV-aktive Verbindungen erkannt werden. Der Versuch wurde aus Substanzmangel nicht wiederholt.

Über die physikalischen Eigenschaften des Akkumulates können infolge seiner leichten Zersetzlichkeit keine exakten

Angaben gemacht werden. So trat z.B. beim Verschicken einer kristallinen Probe vom Schmelzpunkt 178-182° zur massenspektroskopischen Untersuchung Zersetzung ein. Es wurden nämlich nur Massenzahlen von kleinen Bruchstücken, die nicht zugeordnet werden konnten, gefunden, und der Rest der Substanz besaß nicht mehr den angeführten Schmelzpunkt.-

Ein brauchbares IR-Spektrum konnte aus Mangel an Substanz bzw. durch Fehlen einer Mikro-IR-einrichtung nicht erhalten werden.

Experimenteller Teil

Allgemeines.

Die Enzymrohextrakte wurden mit Hilfe des Vibrogen-Gerätes der Firma Bühler, Tübingen, gewonnen.

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit dem Fluoreszenzzusatzgerät ZFM4 zum UV-Spektrophotometer PMQ2 der Firma Zeiss, Oberkochen, ausgeführt.

Die UV-Spektren wurden mit dem UV-Spektrophotometer PMQ2 der Firma Zeiss aufgenommen.

Zur kolorimetrischen Bestimmung der Invertase mit Dinitrosalicylsäure diente das Photometer Eppendorf (Filter 546 nm) der Firma Netheler & Hinz, Hamburg.

Die Drehwertmessungen wurden mit Hilfe des Zeiss-Winkel-Kreis-Polarimeter $0{,}01^{\circ}$ durchgeführt.

Bei der Papierchromatographie kam das Papier Macherey & Nagel Nr. 260 ff zur Anwendung.

Die Hefen wurden ausschließlich in Standkulturen bei 30° gezüchtet.

Verwendete Stämme.

Saccharomyces cerevisiae S 288 C

Stamm H 19 : Genetischer Block zwischen Anthranilsäure und Indol. Akkumuliert Anthranilsäure.

Stamm DX 12: Genetischer Block vor Anthranilsäure. Akkumulat unbekannt.

Stamm E 107: Genetischer Block zwischen Anthranilsäure und Indol. Akkumuliert Anthranilsäure.

Stamm E 40 : Genetischer Block vor Anthranilsäure. Akkumulat unbekannt.

S. cerevisiae NCYC 77. Benötigt Vitamin B_6 zum Wachstum.

Bäckerhefe des Handels.
Neurospora crassa 81: Genetischer Block zwischen Anthranilsäure und Indol.
N. crassa 75001/5212/C167: Akkumuliert Prephensäure.
N. crassa 37401 (ATCC 9683): Zur Bestimmung von Inosit.

Züchtung von Hefen.

Flüssiges Komplettmedium für Hefen:
1 % Hefe-Extrakt (Yeast Extrakt der Firma Difco, Detroit)
1 % Pepton
2 % Saccharose

Minimalmedium für Hefen:

0,875 g	KH_2PO_4	500 γ	H_3BO_3	1 l dest. Wasser
0,125 g	K_2HPO_4	40 γ	$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	
0,5 g	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	100 γ	KJ	
0,1 g	NaCl	200 γ	$FeCl_3$	
0,1 g	$CaCl_2$	400 γ	$MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$	
1,0 g	$(NH_4)_2SO_4$	200 γ	Ammonmolybdat	
10 g	Rohrzucker	400 γ	$ZnSO_4 \cdot 2H_2O$	

Nach Sterilisation wird das Komplettmedium mit der zu untersuchenden Hefe beimpft. Um ein zu schnelles Absitzen der Zellen zu verhindern, mußte öfters geschüttelt werden. Nach 72 bis 96 Stunden konnte abzentrifugiert werden. Die so erhaltenen Hefezellen wurden unter sterilen Bedingungen zweimal mit 5 ml Saline (0,5 g KCl, 0,12 g $MgSO_4$ pro Liter) gewaschen, in etwas Saline suspendiert und in steriles

Minimalmedium gegeben. Im Minimalmedium wurden die Hefen 72 bis 96 Stunden bei 30° gehalten. Das Minimalmedium ermöglicht den Zellen das Stoffwechseln aber nicht weitere Vermehrung. Während des Stoffwechselvorganges geben die Hefen das Akkumulat an das Medium ab. Nach Ablauf der Zeit wurden die Hefezellen durch Sterilfiltration oder Zentrifugation geerntet. Der Überstand wurde auf das Akkumulat aufgearbeitet.

Untersuchung des Akkumulates der Eddy'schen Hefe.

Eddy und Kirsop (37) haben beim S. cerevisiae-Stamm NCYC 77 Anthranilsäure, Indol und Tryptophol neben einer indolähnlichen Substanz, die nicht Indolylglycerin sein soll, als Akkumulat beschrieben.

Die nicht identifizierte indolähnliche Verbindung sollte näher untersucht werden. Hierzu wurde in 4 x 500 ml Komplettmedium die Eddy'sche Hefe vorgezüchtet und nach 3 Tagen wie beschrieben in das Minimalmedium gebracht. Das zu erwartende Akkumulat müßte unter der UV-Lampe durch Fluoreszenz zu erkennen sein. Nach 8 Stunden war unter der UV-Lampe eine leichte Fluoreszenz feststellbar. Nach 24, 48 oder 72 Stunden wurde jeweils aus dem Minimalmedium das Akkumulat isoliert.

1.) Das Akkumulat wurde an wenig vorbehandelter Darco-G-60 Aktivkohle adsorbiert und dann mit größeren Mengen Alkohol eluiert. Der Alkohol wurde am Rundlaufverdampfer bei 30-40° eingeengt und dann chromatographisch untersucht.
2.) Das Minimalmedium wurde am Rundlaufverdampfer bei

30-40° eingeengt, der Rückstand mit absolutem Alkohol (bzw. Äther) extrahiert und nach Abdampfen des Alkohols der Extrakt chromatographiert.

3.) Das Minimalmedium wurde mit Äther extrahiert, die Ätherphase eingeengt und untersucht.

Die Dünnschichtchromatographie in Benzol/Methanol/Wasser (100:70:5) ergab einen Fleck (R_F 0,89) von blauer Fluoreszenz unter der UV-Lampe, der mit Anthranilsäure, und einen mit Ehrlichsreagens nachweisbaren Fleck (R_F 0,77), der mit Indol identisch war.

Das Papierchromatogramm in Methanol/Wasser (1:1) führte ebenfalls nur zur Identifizierung von Anthranilsäure und Indol. Weder Tryptophol noch eine indolähnliche Substanz konnte gefunden werden.

Die Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen bei der S. cerevisiae-Mutante H 19.

Die aus je 1 l Komplettmedium erhaltenen Hefezellen wurden in Minimalmedium gegeben, das einmal Natriumacetat das andere Mal Glucose als Kohlenstoffquelle enthielt. Die pH-Werte der so erhaltenen Medien betrugen:

mit Glucose pH 5,8
mit Acetat pH 6,3.

Nach ca 6 Stunden war im Glucose-Medium unter der UV-Lampe eine blau-grüne Fluoreszenz feststellbar. Im Acetat-Medium war selbst nach 2 Tagen noch keine Fluoreszenz unter der UV-Lampe erkennbar. Hierauf wurde bidestilliertes Glycerin als Kohlenstoffquelle zugegeben. Aber auch dieses führte zu keiner Akkumulation. Zur Überprüfung, ob die Hefen noch lebten, wurden 15 ml 50%-ige sterile Rohrzuckerlösung zuge-

fügt. Nach 12 Stunden war jetzt ein blau-grün fluoreszierendes Akkumulat erkennbar.

Präparation der Darco-G-60-Aktivkohle.

Mehrere Gramm Darco-G-60-Kohle werden mit 2 n HCl versetzt, dann anschließend mit destilliertem Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen. Darauf wird mit 2 n NaOH alkalisch gemacht und wieder bis pH 7,0 gewaschen. Nachdem noch einmal mit 2 n HCl versetzt und wieder neutral gewaschen wurde, ist die Kohle verwendbar.

In einem Chromatographierohr aus Glas mit einem Wattebausch verstopft wurde, wird bis zu einer ca. 1 cm hohen Schicht Kohle gegeben. An dieser Kohleschicht kann dann das Akkumulat adsorbiert und anschließend fraktioniert eluiert werden. Zur Eluierung wurde meist ein Gemisch aus Alkohol und Wasser mit steigender Konzentration an Alkohol benutzt.

Untersuchungen mit Enzymrohextrakten.

1.) Bereitung der Enzymextrakte.

Die Enzymextrakte für die Inkubationsversuche wurden aus Bäckerhefe, S. cerevisiae NCYC 77 und der S. cerevisiae-Mutante DX 12 hergestellt. Die frischen Hefezellen wurden in Phosphatpuffer pH 6,5 bzw. 7,8 aufgeschlämmt und dann bei 0° in dem Vibrogengerät nach W.Zillig und H.Hölzel (41) durch Glasperlen mechanisch zerstört. Die Zentrifugation bei 45 000 x g befreite die Enzymlösung von den Zellrück-

ständen. Die so erhaltene Enzymlösung ist bei 0^{o} einige Tage haltbar, nach Dialyse länger.

Die Inkubationsversuche bei pH 7,8 ergaben kein brauchbares Ergebnis. Die Inkubationsversuche wurden dann bei pH 6,5 durchgeführt.

Ein Inkubationsansatz enthielt:

2,0 ml Enzymlösung (bzw. Phosphatpuffer zur Kontrolle)
0,1 ml Anthranilsäurelösung (300 mg/100 ml)
0,2 ml $MgSO_4.7\ H_2O$-Lösung (450 mg/100 ml)
0,4 ml ATP-Lösung (74 mg/10 ml)
1,9 ml Phosphatpuffer pH 6,5
2,4 ml Glucose-6-phosphat-Lösung (30,4 mg/40 ml)
oder
2,4 ml Ribose-5-phosphat-Lösung (40,5 mg/40 ml)

2.) Reagenzien zum Enteiweißen der Enzymlösung nach Somogyi.

a. Zinksulfatlösung: 25 g $ZnSO_4.7\ H_2O$ werden in 250 ml 0,25 n H_2SO_4 aufgelöst und mit dest. Wasser auf 500 ml aufgefüllt.

b. 0,75 n NaOH. Die Konzentration beider Lösungen ist so berechnet, daß 0,5 ml Natronlauge aus 1 ml Zinksulfatlösung das Zink vollständig als Hydroxyd ausfällen.

3.) Durchführung der Anthranilsäure-Bestimmung (Tab.1)

Nach Beendigung der Inkubationszeit werden 0,5 ml der Inkubationslösung in ein Zentrifugenglas pipettiert, in das vorher bereits 3 ml dest. Wasser und 1 ml Zinksulfatlösung eingefüllt wurden. Die Enzymreaktion wird durch die Säure der Lösung sofort unterbrochen. Nach Zugabe von 0,5 ml 0,75 n Natronlauge wird mit einem Glasstab durchgerührt. Das Eiweiß fällt mit dem Zinkhydroxyd zusammen aus. Man zentrifugiert kurz bei 2000-3000 Touren ab und vermischt

1 ml des klaren Überstandes in einer Küvette mit 2 ml Phosphatpuffer pH 7,0. Dabei darf kein Niederschlag entstehen.

Medium zur Züchtung von Neurospora crassa.

1 Liter destilliertes Wasser

5,0	g Ammoniumtartrat	50	ml Biotinlösung
1,0	g Ammoniumnitrat	0,056	mg H_3BO_3
1,0	g KH_2PO_4	0,350	mg $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$
0,5	g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1,0	mg $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$
0,1	g NaCl	0,08	mg $MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$
0,1	g $CaCl_2$	0,10	mg Ammonmolybdat
20	g Rohrzucker	8,86	mg $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$

Die Biotinlösung bestand aus 25 γ Biotin, 0,1 g KH_2PO_4, 0,1 g K_2HPO_4 und 250 ml dest. Wasser.

Bestimmung der Invertaseaktivität.

Mit 3,5-Dinitrosalicylsäure (47).

a. Rohrzucker-Acetat-Puffer: 43 ml 1 n Natriumacetatlösung und 57 ml 1 n Essigsäure werden in einem 1 l Meßkolben bis zur Marke aufgefüllt. In 96 ml des so erhaltenen Puffers löst man 6,5 g Rohrzucker und gibt zu diesem Gemisch einige Tropfen Toluol. Die Lösung ist etwa 3 Tage haltbar.

b. 3,5-Dinitrosalicylsäure-Reagens: 2 g Dinitrosalicylsäure werden in 70 ml heißem Wasser unter Zugabe von 10 ml 20 proz. Natriumcarbonatlösung gelöst und auf 100 ml aufgefüllt.

Die vorgezüchteten Zellen werden abzentrifugiert, und

der Überstand wird direkt zur Bestimmung der Invertase benutzt.

Zu 5 ml Rohrzucker-Acetat-Puffer (pH 4,5) wird jeweils 1 ml der zu untersuchenden Lösung gegeben. Nach 5 Minuten werden 5 ml 0,1 n NaOH zugefügt, wodurch die Enzymwirkung unterbrochen wird. Zu 1 ml aliquoten Teilen werden 1 ml Dinitrosalicylsäure-Lösung und 2 ml 1,5 proz. Natronlauge zugesetzt, gut umgeschüttelt und 15 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Je nach Farbtiefe wird definiert verdünnt und gegen eine 0,1 proz. Glucosestandardlösung im Photometer Eppendorf bei 546 nm verglichen.

Polarimetrische Bestimmung der Invertase.

In einem 50 ml Meßkolben werden 2,375 g Rohrzucker unter Zusatz von 5 ml (im Falle stark gepufferter Enzymlösungen bis zu 10 ml) 0,2 n Standardacetatpuffer (pH 4,62) gelöst. Man füllt so weit auf, daß für die Enzymlösung noch genügend Raum bleibt, und erwärmt im Thermostaten auf 30°. Dann setzt man eine beliebige, vorher ausgetestete Menge der zu untersuchenden Enzymlösung zu und stoppt die Zeit ab, wenn die Hälfte der Enzymlösung eingelaufen ist. Dieser Zeitpunkt wird als Beginn der Reaktion angenommen. Dann füllt man schnell zur Marke auf und bringt den Kolben in das auf 30° eingestellte Wasserbad. In den meisten Fällen zeigen die Enzymlösungen keine Eigendrehung. Man entnimmt nun zu verschiedenen Zeiten 5 ml als Probe, trägt sie in 10 ml 2 n Natriumcarbonat-Lösung ein, mischt und mißt den Drehwert im 2-dm-Rohr bei 20°.

Drehwertbestimmung einiger Lösungen.

Die spezifische Drehung einer Lösung wird berechnet nach:

$$[\alpha]_D^{\mu} = \frac{100 \cdot \bar{\alpha}}{l \cdot c}$$

$\bar{\alpha}$ = gemessener Winkel

l = Schichtdicke in dm

c = g in 100 ml

20 g Rohrzucker in 1 l Wasser (2 % Rohrzucker) $\bar{\alpha} = 2{,}58$ $[\alpha]_D^{\mu} = 64{,}5^{\circ}$

2,375 g Rohrzucker in 40 ml Wasser + 10 ml Acetatpuffer (pH 4,6) (4,75 % Rohrzucker) $\bar{\alpha} = 6{,}27$ $[\alpha]_D^{\mu} = 66^{\circ}$

2,375 g Rohrzucker in 30 ml Wasser + 10 ml Acetatpuffer + 10 ml Medium bewachsen mit S. cerevisiae NCYC 77 $\bar{\alpha} = 1{,}73$ $[\alpha]_D^{\mu} = +18{,}2^{\circ}$

1,90 g Rohrzucker + 40 ml Acetatpuffer + 10 ml Medium f. Hefen (unbewachsen) (ca. 3 % Rohrzucker) $\bar{\alpha} = 5{,}45$ $[\alpha]_D^{\mu} = 61{,}9^{\circ}$

Medium f. Hefen vor dem Stoffwechseln (1 % Rohrzucker) $\bar{\alpha} = 1{,}30$ $[\alpha]_D^{\mu} = 65^{\circ}$

Medium f. Hefen nach dem Stoffwechseln $\bar{\alpha} = -0{,}71$ $[\alpha]_D^{\mu} = -17{,}7^{\circ}$

Medium f. N. crassa vor dem Stoffwechseln (2 % Rohrzucker) $\bar{\alpha} = 2{,}68$ $[\alpha]_D^{\mu} = 67^{\circ}$

Medium f. N. crassa nach dem Stoffwechseln $\bar{\alpha} = -0{,}71$ $[\alpha]_D^{\mu} = -17{,}7^{\circ}$

Medium f. N. crassa nach der Säurehydrolyse $\bar{\alpha} = -0{,}70$ $[\alpha]_D^{\mu} = -17{,}5^{\circ}$

Die Gewinnung des Akkumulates der S. cerevisiae-Mutante E 40 .

Die Minimalmedien der Mutanten E 40 und DX 12 zeigten in den UV-Spektren des Überstandes zwei von einander verschiedene Akkumulate an. Da die bewährte Aufarbeitungsmethode der Adsorption an Aktivkohle und anschließende Eluation mit Alkohol zu keiner Fraktion mit den zu erwartenden UV-Maxima führte, wurde die Extraktion der Akkumulate mit verschiedenen organischen Lösungsmittel versucht. Bei der Mutante E 40 erwies sich Essigester als geeignetes Extraktionsmittel. Hierbei tritt das Phänomen einer intensiven roten Fluoreszenz unter der UV-Lampe in der Essigesterphase auf. Beim Ausschütteln des Essigesters mit dest. Wasser bleibt die rote Fluoreszenz in der organischen Phase, während in der wäßrigen Phase eine Substanz mit den UV-Maxima bei 224 nm und 274 nm enthalten war. Diese Substanz wurde, in der später bestätigten Annahme, daß es ein Anthranilsäurevorprodukt ist, genauer untersucht.

Stoffwechseln unter pH-Kontrolle.

Die Mutante E 40 wurde vorgezüchtet, abzentrifugiert und in steriles Minimalmedium gegeben, das vorher mit 1 n NaOH auf pH 7,0 gebracht worden war. Das durch einen Magnetrührer gerührte Minimalmedium wurde mit Hilfe eines Kontaktthermometers bei 30^{o} gehalten. Die beim Stoffwechseln auftretende Säuerung wurde automatisch mit dem Metrohm-Potentiometer E 187 mit kombinierter Glaselektrode EA 120 U

das über einen Norfa-Regler mit einem Magnetventil gekoppelt war, mit 1 n NaOH neutralisiert. Nach 72 Stunden war im UV-Spektrum des Überstandes kein Akkumulat feststellbar, und auch nach der Extraktion mit Essigester konnte weder eine rote Fluoreszenz beobachtet noch eine UV-aktive Substanz isoliert werden.

Die Eigenschaften des Akkumulates der E 40.

Die oben angeführten UV-Maxima wurden in saurer und alkalischer Lösung nicht verschoben.

Im Papierchromatogramm befand sich die Substanz im Laufsystem Methanol/Wasser 1:1 beim R_F-Wert 0,80 und im Laufsystem n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 beim R_F-Wert 0,42. Die Chromatogramme wurden mit einer Reihe von Sprühreagentien behandelt,und dabei zeigten sich folgende Reaktionen:

Ehrlich's-Reagens	negativ
T T C (kalt)	positiv
2,6-Dichlorphenolindophenol	negativ
Anilinphthalat	negativ
Ninhydrin	negativ
Phenitrazol	negativ
Eisen-3-chlorid	negativ
Tetracyanoäthylen	negativ
Tetranitromethan	negativ
Bromkresolpurpur	positiv
Rhodamin B	positiv
Glucose-H_3PO_4	negativ
Arnow-Reagens	negativ
Perjodat-Benzidin	positiv

Hemmversuch mit 4-Methyl-DL-tryptophan und D-Tryptophan.

Die vorgezüchteten Hefezellen der Mutanten DX 12, E 107 und E 40 wurden zum Stoffwechseln in Minimalmedien gebracht, welche zur Ergänzung 20 γ/ml D-Tryptophan enthielten. Nach Ablauf der üblichen Stoffwechselzeit konnten durch UV-Spektroskopie und Papierchromatographie die jeweiligen Akkumulate nachgewiesen werden. Auch bei der Zugabe von 20 γ/ml 4-Methyl-DL-tryptophan zu den Minimalmedien konnte, nach den UV-Spektren wohl deutlich weniger, Akkumulat isoliert werden. - Bei Gaben von 200 γ/ml 4-Methyl-DL-tryptophan war bei allen drei Mutanten kein Akkumulat mehr nachweisbar.

Über die Einwirkung von 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin auf verschiedene Hefemutanten.

Das 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin wurde nach der Vorschrift von F.Weygand hergestellt.

Die Mutanten E 40, DX 12 und E 107 wurden in Minimalmedien gebracht, in das 20 γ/ml DON zur Ergänzung gegeben waren. Die Akkumulatbildung wurde durch die UV-Spektren der Überstände, durch die Extraktion des Akkumulates mit Essigester und anschließender Untersuchung mittels UV-Spektroskopie und Papierchromatographie kontrolliert.

Das UV-Spektrum des Überstandes war bei den Mutanten DX 12 und E 107 verändert. Nach Extraktion wurde auch bei

diesen Mutanten das unter normalen Bedingungen bei der Mutante E 40 auftretende Akkumulat isoliert.

UV-Maxima nach Extraktion:

E 40	224 nm und 274 nm
E 107	223 nm und 274 nm
DX 12	224 nm und 275 nm

Die R_F-Werte stimmten in den Laufsystemen "Partridge" und Methanol/Wasser ebenfalls gut überein.

Versuche zur Reindarstellung des Akkumulates der E 40.

Die Reindarstellung des sehr instabilen Akkumulates der Mutante E 40 ist durch Extraktion nicht möglich, da einige Verunreinigungen sehr ähnliches Verhalten zeigen.

Das Akkumulat ist als Carbonsäure durch Schwermetalle fällbar. Es wurde das Barium- und Zinksalz in methanolischer Lösung gefällt und durch Zentrifugation gewonnen. Die Rückgewinnung der freien Säure aus diesen Salzen gelang nicht, da hierbei Zersetzung eintrat.

Beim Zusammengeben der genau neutralisierten methanolischen Lösung der Substanz mit der äquivalenten Menge an S-Benzylisothiuroniumchlorid entstand in geringer Menge ein nach dem Schmelzpunkt sehr unsauberes Produkt. Infolge seiner leichten Löslichkeit in allen untersuchten Lösungsmitteln konnte es nicht umkristalisiert werden.

Bei dem Versuch, das Akkumulat im Hochvakuum (<0,01 Torr) zu reinigen, wurde am Kühlfinger der Sublimationsapparatur Phenol erhalten.

UV-Maxima in Methanol:

Phenol: 224 nm, 273 nm; alkalisch: 237 nm, 288 nm.
Substanz
n. HV. : 223 nm, 273 nm; alkalisch: 236 nm, 289 nm.

Nachweisreaktionen:

1.) Phenolnachweis nach Eegriwe (80)
Ein Tropfen der Probe wird mit etwas festem m-Nitrobenzaldehyd versetzt. Nach Zufügen von 2 ml etwa 63 porz. H_2SO_4 (1 Tl. konz. H_2SO_4 + 1 Tl. H_2O) erwärmt man 10 Minuten im Wasserbad von 65°. Bei Anwesenheit von Phenol tritt Rosafärbung auf. Erfassungsgrenze 5γ.
Die Raktion verlief mit der aus der Hochvakuumbehandlung erhaltenen Substanz positiv.

2.) Als Tribromphenol.
Zu der wäßrigen Lösung gibt man Bromwasser, daß sofort entfärbt wird. Es entsteht ein weißer, flockiger Niederschlag. Der Schmelzpunkt des so erhaltenen Produktes war: Schmp. 82-84°.
Der Schmelzpunkt von Tribromphenol beträgt: 86-88°.
Beim Mischschmelzpunkt trat keine Depression auf.

Um die Zersetzung bei der Hochvakuumbehandlung nach Möglichkeit zu verhindern, wurde das Akkumulat mit Diazomethan verestert. Das Umsetzungsprodukt zeigte bei gleicher Absorption im UV keine Reaktion auf Säure. Aber auch beim Ester trat offensichtlich im Hochvakuum Zersetzung ein. Es entstand nach dem UV-Spektrum zu schließen ein Gemisch mehrerer Substanzen, die nicht identifiziert werden konnten. So waren p-Hydroxybenzoesäuremethylester, Brenztraubensäuremethylester und m-Hydroxybenzoesäuremethylester nicht unter diesen Substanzen.

Die Perjodatoxydation.

Zu der Lösung des E 40-Akkumulates in 0,01 n NaOH wurde Kaliumperjodat zugegeben und die Mischung bei Raumtemperatur 8 Stunden stehen gelassen. Hierbei trat eine langsame Verschiebung des UV-Maximums bei 274 nm zu kürzeren Wellenlängen ein und lag nach Ablauf der Reaktion bei 268-270 nm. Dieses UV-Maximum weist auf einen Mucondialdehyd hin (74). Zu der Reaktionsmischung wurde gesättigte Bariumchloridlösung zugetropft, bis kein Niederschlag mehr entstand. Es wurde vom Niederschlag abzentrifugiert und abfiltriert. Die Lösung wurde am Rundlaufverdampfer eingeengt, der Rückstand mit etwas Äthanol aufgenommen und mit 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung versetzt. Nach Abkühlen und Anreiben entstand ein gelb-roter Niederschlag. Das UV-Maximum des so erhaltenen 2,4-Dinitrophenylhydrazons in Äthanol lag bei 398 nm, was auf das bis-2,4-Dinitrophenylhydrazon eines Mucondialdehyds (70) hinweist.

Bei der Papierchromatographie im System n-Butanol/Äthanol/0,5 n NH_4OH (7:2:1) wurde mit den R_F-Werten 0,58 und 0,70 das Dinitrophenylhydrazon der Brenztraubensäure identifiziert. Ein weiteres 2,4-Dinitrophenylhydrazon lief an der Lösungsmittelfront mit.

Fällung eines 2,4-Dinitrophenylhydrazons.

Enoläther werden schon durch starke Säuren gespalten. Bei der Spaltung des E 40-Akkumulates ist Brenztraubensäure zu erwarten. Beim Erhitzen des Akkumulates in schwefel-

saurer Lösung in Gegenwart von 2,4-Dinitrophenylhydrazin, war nach 3 Stunden wenig dunkelroter Niederschlag entstanden. Das Hydrazon konnte aus dem Reaktionsgemisch auf Grund seiner sauren Eigenschaften extrahiert und gereinigt werden. Das isolierte 2,4-Dinitrophenylhydrazon zeigte bei der Chromatographie gute Übereinstimmung mit dem 2,4-Dinitrophenylhydrazon der Brenztraubensäure.

Untersuchung der Reaktion mit Triphenyltetrazoliumchlorid.

Das Triphenyltetrazoliumchlorid wird durch reduzierende Substanzen in das rot gefärbte, schwerlösliche Triphenylformazan umgewandelt. Da es unklar war, welches Produkt bei der Triphenyltetrazoliumchlorid-einwirkung aus dem Akkumulat der E 40 entsteht, wurde die Substanz am Startfleck eines Chromatogramms mit Triphenyltetrazoliumchlorid behandelt und anschließend entwickelt. Alle Versuche, irgendwelche Folgeprodukte nachzuweisen, schlugen jedoch fehl. Es stellte sich heraus, daß auch Protocatechusäure und Brenzkatechin mit Triphenyltetrazoliumchlorid reagieren.

Die katalytische Hydrierung.

In einer normalen Hydrierungsapparatur wurden ca. 2 mg Platindioxyd in 3 ml mit HCl angesäuertem Methanol vorhydriert. Nach Zugabe einer Lösung von etwa 10 mg Akkumulat in 2 ml Methanol war eine Wasserstoff-aufnahme fest-

stellbar. Nach einer Stunde war keine UV-aktive Substanz mehr in der Lösung. Der durch Einengen des Filtrates erhaltene Rückstand wurde der Ätherspaltung unterworfen.

Die Ätherspaltung (79).

Zu der Lösung der durch katalytische Hydrierung erhaltenen Substanz in 3 ml Acetanhydrid wurden 0,5 ml Bortrifluorid-ätherat und 0,5 g wasserfreies Lithiumbromid gegeben. Nachdem die Mischung ca. 30 Stunden bei Raumtemperatur gestanden hatte, wurde sie in ca. 50 ml Eiswasser gegossen, zur Trockne eingeengt und chromatographiert. Als Nachweisreagentien dienten Bromkresolpurpur und Perjodat/Benzidin.

Darstellung der trans-3,4-Dihydroxycyclohexancarbonsäure (75).

1.) Δ^3-Tetrahydrobenzoesäure (76).

72 g (1 Mol) Acrylsäure, 64 g Butadien (1,2 Mol) und 1 g Hydrochinon wurden in einem 1/2 l Stahlautoklaven 30 Minuten auf 160-165° erhitzt. Das Reaktionsprodukt ergab bei der Vakuumdestillation (12 mm) das gewünschte Produkt.

Ausbeute: 96 g (83 % d. Th.) Sdp.$_{12}$ 119-122°
Schmp. 17°

2.) trans-3,4-Dihydroxycyclohexancarbonsäure(1).

5,0 g Δ^3-Tetrahydrobenzoesäure läßt man unter Eiskühlung innerhalb von 60 Minuten in die energisch gerührte Lösung von 3,0 ml 30 proz. H_2O_2 in 20 ml 85 proz. Ameisensäure eintropfen, erwärmt noch 60 Minuten auf 40° (genau einhalten!) und läßt 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen. Nach Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum (<40°) hinterbleibt ein hellgelbes Öl, das in 40 ml Wasser gelöst und anschließend 2 Stunden unter Rückfluß gekocht wird. Man dampft wieder zur Trockne ein. Das Reaktionsprodukt kristallisiert nach Anreiben mit Essigester und wird aus Essigester unter Zusatz von etwas Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 3,0 g (47 % d. Th.) Schmp. 133-135°

Die Papierchromatographie der hergestellten trans-3,4-Dihydroxycyclohexancarbonsäure mit der durch Hydrierung und Ätherspaltung erhaltenen Substanz ergab:

aufsteigend in Partridge-Gemisch:

3,4-Dihydroxycyclohexancarbonsäure	R_F 0,80	
Substanz n. Hydrierung u. Ätherspaltung	R_F 0,80	

Ringchromatogramm mit Partridge-Gemisch:

3,4-Dihydroxycyclohexancarbonsäure	R_F 0,78	
Substanz n. Hydrierung u. Ätherspaltung	R_F 0,78	0,65
Milchsäure	R_F	0,65

Die katalytische Disproportionierung.

Zu der wäßrigen Lösung von E 40 Akkumulat wurden direkt oder nach Neutralisation etwa 10 mg Palladium-katalysator auf Aktivkohle gegeben und die Mischung 2-3 Stunden rückfließend gekocht. Nach Abkühlen wurde abfiltriert, die Aktivkohle mehrmals mit einem Methanol-Ammoniak-Gemisch eluiert, und die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum bei 40° eingeengt. Die zurückbleibende Substanz wurde für die Enolätherspaltung in 2n HCl aufgenommen und 10 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Die so erhaltene Substanz wurde näher untersucht.

Durch Dünnschichtchromatographie konnte aus dem Gemisch mit dem R_F-wert 0,69 eine auch nach dem UV-Spektrum in alkalischer methanolischer Lösung mit der Protocatechusäure übereinstimmende Substanz erhalten.

Das Ergebnis der Chromatographie war:

	20% KCl in H_2O	n-BuOH H_2O ges.	Kieselgel G Benzol/ MeOH/Eisessig(90:16:8)
Substanz	0,41 0,59 0,75 0,87	0,58	0,52 0,69 0,85 0,90
Protocatechusäure	0,75	0,59	0,69
p-Hydroxybenzoesäure	0,59	---	0,85
Brenztraubensäure	0,42 0,88	---	0,53 0,90

Das Akkumulat der E 40 wurde mit 6n HCl im siedenden Wasserbad 8 Stunden behandelt. Dabei trat eine Veränderung des UV-Spektrums ein. Jedoch entstand nicht nur eine einzige Verbindung, sondern aus dem Gemisch konnten durch Papierchromatographie Brenztraubensäure und p-Hydroxybenzoesäure

sowie zwei weitere UV-aktive Substanzen nachgewiesen werden.

Zusammenfassung.

Die Biosynthese des Tryptophans verläuft bei Enterobacteriaceen über 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose-5-phosphat. Diese Verbindung wurde in entphosphorylierter Form in den Kulturfiltraten entsprechend blockierter Tryptophanmangelmutanten als Akkumulat aufgefunden. Bei Hefen und Neurospora crassa war hingegen als Akkumulat 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fructose nachgewiesen worden.

Enzymextrakte aus Saccharomyces cerevisiae setzten aber Anthranilsäure in Gegenwart von ATP nur bei Zusatz von Ribose-5-phosphat, nicht aber von Glucose-6-phosphat um. Daraus läßt sich ableiten, daß der bei Bacterien erschlossene Syntheseweg des Tryptophans auch für Hefen Gültigkeit hat.

Die Bildung der Fructose-Amadori-Verbindung kann folgendermaßen erklärt werden. Im rohrzuckerhaltigen Medium der Mutanten läßt sich extracelluläre Invertase nachweisen. Akkumulierte Anthranilsäure liefert mit der durch Invertasewirkung entstandenen Glucose des Mediums spontan das Glucosylamin, das leicht der Amadori-Umlagerung unterliegt.

Die Biosynthese der Anthranilsäure ist noch weitgehend unbekannt, und Akkumulate geeignet blockierter Mangelmutanten sind bisher nicht beschrieben worden.

Aus dem Medium einer vor der Anthranilsäure blockierten Saccharomyces cerevisiae-Mutante ließ sich ein stickstofffreies Vorprodukt der Anthranilsäure isolieren. Seine Eigenschaften stimmen mit der Struktur eines 3-Enolbrenztraubensäure-äthers der trans-3,4-Dihydro-protocatechusäure überein. Das Akkumulat, mit UV-Maxima bei 224 nm und 274 nm in Wasser, reagiert in der Kälte mit alkalischer Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung und verhält sich negativ gegenüber 2,6-Dichlorphenolindophenol. Beim Erhitzen im Hochvakuum

liefert es Brenztraubensäure und Phenol. Disproportionierung von neutralisiertem Akkumulat an Pd/C führt zu einer aromatischen Verbindung, die nach Ätherspaltung Protocatechusäure und Brenztraubensäure ergibt; im nicht neutralisierten Ansatz entsteht bevorzugt p-Hydroxybenzoesäure und Brenztraubensäure. Das Akkumulat läßt sich mit Perjodat spalten. Neben dem 2,4-Dinitrophenylhydrazon der Brenztraubensäure wurde ein weiteres saures 2,4-Dinitrophenylhydrazon erhalten. Sein UV-Spektrum stimmt überein mit dem eines 2,4-Dinitrophenylhydrazons eines Mucondialdehydes. Durch Hydrierung mit Pt/H_2 entsteht eine kristalline Verbindung, die bei Ätherspaltung unter milden Bedingungen Milchsäure und eine Substanz liefert, die sich papierchromatographisch wie trans-3,4-Dihydroxy-cyclohexancarbonsäure verhält.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1) B.D.Davis J.biol.Chemistry 191, 315 (1951)
2) H.T.Shigeura u. D.B.Sprinson
Federation Proc. 11, 286 (1952)
3) F.Lingens u. H.Hellmann
Z.Naturforsch. 13 b, 462 (1958)
4) J.J.Salomon u. B.D.Davis
J.Amer.chem.Soc. 75, 5567 (1953)
5) U.Weiss, B.D.Davis u. E.S.Mingioli
J.Amer.chem.Soc. 75, 5572 (1953)
6) P.R.Srinivasan, M.Katagiri u. D.B.Sprinson
J.biol.Chemistry 234, 713 (1959)
7) B.D.Davis u. E.S.Mingioli
J.Bacteriol. 60, 17 (1950)
8) J.G.Levin u. D.B.Sprinson
Biochem.Biophysica Res.Comm. 3, 157 (1960)
9) B.D.Davis Science 118, 250 (1953)
10) M.Katagiri u. R.Sato Science 118, 251 (1953)
11) U.Weiss, C.Gilvarg, E.S.Mingioli u. B.D.Davis
Science 119, 774 (1954)
12) P.Fildes Brit.J.exp.Pathol. 21, 315 (1940)
13) E.E.Snell Arch.Biochem.Biophysics 2, 389 (1943)
14) E.L.Tatum u. D.M.Bonner
Proc.nat.Acad.Sci.USA 30, 30 (1944)
15) E.L.Tatum, D.M.Bonner u.G.W.Beadle
Arch.Biochem.Biophysics 3, 477 (1944)
16) C.Yanofsky J.biol.Chemistry 194, 279 (1952)
17) E.L.Tatum u. D.Shemin J.biol.Chemistry 209, 671 (1954)
18) D.E.Metzler, M.J.Ikawa u. E.E.Snell
J.Amer.chem.Soc. 76, 648 (1954)

19) C.W.Partridge, D.M.Bonner u. C.Yanofsky
J.biol.Chemistry 194, 269 (1952)
20) J.F.Nyc, H.K.Mitchell, E.Liefer u. H.W.Langham
J.biol.Chemistry 179, 783 (1949)
21) C.Yanofsky Science 121, 138 (1955)
22) Amino Acid Metabolism, McElroy u. B.Glass S.931
John Hopkins Press 1955
23) C.Yanofsky J.biol.Chemistry 217,345 (1955)
24) C.Yanofsky Biochim.Biophysica Acta (Amsterdam)
16, 594 (1955)
25) F.Lingens, H.J.Burkhardt, H.Hellmann u. F.Kaudewitz
Z.Naturforsch. 12 b, 493 (1957)
26) F.Gibson, M.J.Jones u. H.Teltscher
Nature 175, 853 (1955)
27) C.Yanofsky J.biol.Chemistry 223, 171 (1956)
28) C.H.Doy u. F.Gibson
Biochem. J. 72, 586 (1959)
29) F.Gibson, C.H.Doy u. S.B.Segall
Nature 181, 549 (1958)
30) O.H.Smith u. C.Yanofsky
J.biol.Chemistry 235, 2051 (1960)
31) L.W.Parks u. H.C.Douglas
Biochim.Biophysica Acta (Amsterdam)
23, 207 (1957)
32) F.Lingens, M.Hildinger u. H.Hellmann
Biochim.Biophysica Acta (Amsterdam)
30, 668 (1958)
33) B.N.Ames u. H.K.Mitchell
J.biol.Chemistry 212, 687 (1955)
34) F.Lingens u. S.Kern Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.
318, 56 (1960)
35) F.Lingens u. H.Hellmann
Liebigs Ann.Chem. 630, 84 (1960)
36) F.Lingens u. E.Schraven
Liebigs Ann.Chem. 655, 167 (1962)

37) A.A.Eddy J.Gen.Microbiol. 13,XIII (1955)
A.A.Eddy u. B.Kirsop J.Inst.Brewing 61, 388 (1955)
38) L.E.Rhuland u. R.C.Bard
J.Bacteriol. 63, 133 (1952)
39) C.H.Doy Rev.of Pure and Applied Chem.
10, 185 (1960)
40) E. Schraven Dissert. Univ. Tübingen 1962
41) W.Zillig u. H.Hölzel Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.
312, 140 (1958)
42) F.Weber Dissert. Univ. Tübingen 1955
43) M.Somogyi J.biol.Chem. 86, 655 (1930)
44) F.Lingens u. S.Lingens unveröffentl.
45) J.E.Hodge Advances Carbohydrate Chem.
10, 169 (1955)
46) F.Micheel u. B.Schleppinghoff
Chem. Ber. 89, 1702 (1956)
F.Micheel u. J.Dijong
Liebigs Ann.Chem. 658, 120 (1962)
47) J.B.Sumner u. S.F.Howell
J.biol.Chemistry 108, 51 (1935)
48) R.Weidenhagen in Bamann-Myrbäck Methoden der Ferment-
forschung, Bd. 2 S. 1726
Thieme-Verlag, Leipzig 1941
49) H.M.Rauen Biochem.Taschenbuch, S. 486
Springer-Verlag, Berlin 1956
50) L.J.Wickerham u. R.G. Dworschak
Arch.Biochem.Biophysics 78, 497 (1958)
51) R.L.Metzenberg Arch.Biochem.Biophysics 96, 468 (1962)
52) P.R.Srinivasan J.Amer.chem.Soc. 81, 1772 (1959)
53) P.R.Srinivasan u. B.Weiss
Proc.nat.Acad.Sci. USA 45, 1491 (1959)
54) D.B.Sprinson Advances Carbohydrates Chem.
15, 235 (1960)

55) B.D.Davis u. E.S.Mingioli
J.Bacteriol. 66, 129 (1953)
56) B.D.Davis u. E.S.Mingioli
J.Bacteriol. 60, 17 (1950)
57) J.Monod u. G.Cohen-Bazire
C.R.hebd. Seances Acad.Sci.
236, 530 (1953)
58) H.J.Vogel Proc.nat.Acad.Sci. USA 43, 491 (1957)
59) J.S.Gots u. E.G.Gollub
Proc.of the Soc. f. Exp. Biol. and Medicine
2, 207 (1957)
60) A.B.Pardee u. L.S.Prestidge
Biochim.Biophysica Acta (Amsterdam)
27, 330 (1958)
61) P.A.Trudinger u. G.N.Cohen
Biochem.J. 62, 488 (1956)
62) H.S.Moyed J.biol.Chemistry 236, 2261 (1961)
Cold Spring Habor Symposia Quant. Biol.
26, 323 (1961)
63) H.S.Moyed J.biol. Chemistry 235, 1098 (1960)
64) F.Lingens Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.
331, 56 (1963)
65) J.M.Buchanan, S.C.Hartman u. B.Levenberg
J.Amer.chem.Soc. 77, 501 (1954)
66) S.C.Hartman, B.Levenberg u. J.M.Buchanan
J.biol.Chemistry 221, 1057 (1956)
67) B.Levenberg, J.Melnick u. J.M.Buchanan
J.biol. Chemistry 225, 163 (1957)
68) L.Kaplan, H.C.Reilly u. C.C.Stock
J.Bacteriol. 78, 511 (1959)
69) F.Weygand, H,J.Bestmann u. E.Krieger
Chem.Ber. 91, 1039 (1958)
70) M.Daniels, G.Scholes u. J.Weiss
J.Chem.Soc. (London) 1956, 832

71) R.H.Lenhard u. S.Bernstein
J.Amer.chem.Soc. 78, 989 (1956)
72) F.Gibson u. L.M.Jackman
Nature 198, 388 (1963)
73) R.D.McCormick, J.Reichenthal, U.Hirsch u. N.O.Sjolander
J.Amer.chem.Soc. 83, 4104 (1961)
J.Amer.chem.Soc. 84, 3711 (1962)
74) M.Nakajima u. N.Kurihara
Chem.Ber. 92, 166 (1959)
L.R.Morgan jr. J.org. Chem. 27, 1208 (1962)
75) R.Grewe, A.Heinke u. Chr.Sommer
Chem.Ber. 89, 1978 (1956)
76) F.X.Weber, J.E.Jansen u. T.L.Gresham
J.Amer.chem.Soc. 74, 534 (1952)
77) N.D.Zelinsky u. G.S.Pawlow
Chem.Ber. 66, 1420 (1933)
78) D.Swern, G.N.Billen, Th.W.Findley u. Y.T.Scanlan
J.Amer.chem.Soc. 67, 1786 (1945)
79) R.D.Youssefyeh u. Y.Mazur
Tetrahedron Letters 26, 1287 (1962)
80) E.Eegriwe Mikrochemie 23, 143 (1937)
81) H.Plieninger u. G.Ege
Chem.Ber. 94, 2088 (1961)

Lebenslauf

Am 25. Februar 1931 wurde ich, Wolfgang Siegfried Ernst Lück, als Sohn des Polizeibeamten Ernst Lück und seiner Ehefrau Christel, geb. Liedtke, in Sensburg/Ostpr. geboren.

Von 1937 bis 1942 besuchte ich in Allenstein/Ostpr. die Grundschule und dann das Staatl. Humanistische Gymnasium in Allenstein. Am 21. Januar 1945 mußte ich mit meinen Eltern infolge der Kriegseinwirkung Allenstein verlassen. Ab 6. Februar 1945 wohnten wir in Bernburg a.d.Saale. Hier ging ich auf die Oberrealschule. Die Umschulung und die Schulreform der sowjetischen Besatzungszone führten zu einer Rückversetzung. Im Frühjahr 1951 bestand ich an der Karl-Marx-Oberrealschule in Bernburg die Reifeprüfung. Im September 1951 begann ich die Lehre für Chemiewerker und Laboranten in der Sodafabrik Bernburg, die durch meine Flucht nach Westdeutschland im Oktober 1952 abgebrochen wurde. Von Oktober 1952 bis Oktober 1953 arbeitete ich bei einer Baufirma in Mülheim/Ruhr, dem jetzigen Wohnsitz meiner Eltern. Während dieser Zeit bereitete ich mich auf die Ergänzungsprüfung zum Ostzonenabitur vor. Im April 1953 legte ich in Dortmund diese Prüfung ab.

Im Wintersemester 1953/54 immatrikulierte ich mich an der Universität Tübingen für das Studium der Chemie. Im Mai 1957 bestand ich hier das Vorexamen für Chemiker. Das Wintersemester 1957/58 und das Sommersemester 1958 studierte ich in Innsbruck-Österreich, und seit Wintersemester 1958/59 bin ich wieder an der Universität Tübingen. Im Februar 1961 legte ich die

mündliche Diplomprüfung für Chemiker ab. Am 12. August 1961 heiratete ich Ingeborg Martha Metka. Seit März 1961 arbeitete ich unter der Leitung von Herrn Dozenten Dr. F. Lingens an meiner Diplom- und Doktorarbeit. Das Thema meiner Doktorarbeit lautete: "Ein Beitrag zur Untersuchung der Biosynthese des Tryptophans in Saccharomyces cerevisiae."

Meine akademische Ausbildung verdanke ich folgenden Herren Professoren und Dozenten:

in Chemie: H.Bretschneider, K.Brodersen, F.Cap, H.Hellmann, K.v.Hohenlohe-Oehringen, W.Klötzer, G.Kortüm, Eugen Müller, G.Opitz, W.Rüdorff, G.Wittig

in Physik und Mathematik: W.Kossel, G.Möllenstedt, R.Mühleisen, W.Schweizer

in Biochemie und Mikrobiologie: A.Butenandt, H.Friedrich-Freksa, A.Gierer, F.Kaudewitz, F.Lingens

in Mineralogie: W.v.Engelhardt, K.Spangenberg.